

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: www.jpptet.net
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 рецензируе-
мых научных журналов и изданий,
рекомендованных ВАК России для пуб-
ликации значимых результатов диссертаци-
он на соискание ученой степени докто-
ра и кандидата наук.

ИФ РИНЦ 2013 0,600

Журнал включен в базу данных Scopus

Журнал «Патологическая физиология и
экспериментальная терапия» индексиру-
ется 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

Подписные индексы
по каталогу агентства «Роспечать»:
для индивидуальных подписчиков **71456**
для предприятий и организаций **72151**

Сдано в набор 15.10.2016 г.
Подписано в печать 21.11.2016 г.

ISSN 0031-2991

Пат. физиол. и экспер. тер.
2016. Том 60. № 4. 1–184

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

© ИП Иришкин Дмитрий Андреевич, 2016.

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 60, № 4, 2016

Октябрь—декабрь

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), С.А. Хачатрян (Ереван),
В. Шварц (Германия), А.П. Ястребов (Екатеринбург)

125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

Home page: www.jpvet.net
E-mail: path.physiol@yandex.ru

ЛР №010215 от 29.04.97.

E-mail: genius-media@mail.ru

ИФ РИНЦ 2013 0,600

ISSN 0031-2991
Pathological
physiology
and experimental
therapy
2016. Vol. 60. № 4. 1–184

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. 60, № 4, 2016

October—December

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), S.A. Khachatryan (Erevan),
V. Shvarz (Germany), A.P. Yastrebov (Ekaterinburg)

Moscow

© ИП Иришкин Дмитрий Андреевич, 2016.

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>Сергеева С.П., Шишкина Л.В., Литвицкий П.Ф., Бреславич И.Д., Виноградов Е.В.</i> Изменения структуры нейронов и астроцитов серого вещества головного мозга при его острой локальной ишемии у человека.	4
<i>Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н.</i> Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты при введении кормящим крысам изменяют развитие экспериментального тревожно-депрессивного состояния у крысят, подвергнутых действию дипротина А на второй – третьей неделях после рождения.	9
<i>Кузнецова Л.В., Карпова М.Н., Зинковский К.А., Клишина Н.В.</i> Противосудорожные эффекты цитиколина и диазепама при их сочетанном применении на модели острых генерализованных судорог, вызванных пентилентетразолом, у крыс линии Вистар.	20
<i>Никитина И.Л., Ходулева Ю.Н., Масель А.С., Байрамов А.А., Шабанов П.Д.</i> Система KISS-KISS1R: периферический сигналинг в андрогензависимых тканях в модели мужского гипогонадизма.	24
<i>Шакова Ф.М., Калинин Т.И., Гуляев М.В., Черемных А.М., Юрин В.Л., Романова Г.А.</i> Нейропротективный и антиаггенический эффекты мутантных молекул эритропоэтина на модели фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга крысы.	34
<i>Труш В.В., Соболев В.И.</i> Влияние иатрогенного гиперкортицизма, индуцируемого длительным введением дексаметазона, на энергетику мышечного сокращения у белых крыс.	39
<i>Кузник Б.И., Давыдов С.О., Степанов А.В., Морарь Н.В.</i> Влияние кинезитерапевтических процедур на содержание ирисина у женщин с заболеваниями сердечно-сосудистой системы в зависимости от массы тела и гормонального статуса.	47
<i>Валеев В.В., Трашкова А.П., Коваленко А.Л., Петров А.Ю., Васильев А.Г.</i> Новый вазодиллятор натрия-L-аргинина сукцинат в профилактике и лечении доксорубин-индуцированной кардиотоксичности.	52
<i>Гурьянов М.И.</i> Организованная структура фибрилляции желудочков у собак с ишемией миокарда.	58
<i>Заднипряный И.В., Третьякова О.С., Сатаева Т.П.</i> Кардиоцитопротекторный эффект Цитофлавина в условиях экспериментальной перинатальной гемической гипоксии.	64
<i>Матвеева Л.В., Мосина Л.М.</i> Взаимосвязь секреторной активности желудка и иммунных изменений периферической крови при ulcerogenesis желудка.	72
<i>Тиньков А.А., Гатиатулина Е.Р., Попова Е.В., Полякова В.С., Скальная А.А., Аглетдинов Э.Ф., Никоноров А.А., Радыш И.В., Карганов М.Ю., Скальный А.В.</i> Влияние адипогенной диеты в раннем возрасте на содержание микроэлементов в тканях крыс.	79
<i>Генинг Т.П., Долгова Д.Р., Абакумова Т.В., Антонева И.И., Насырова Е.Ю., Генинг С.О.</i> Влияние аутогемомимотерапии по схеме САР на редоксзависимые процессы в эритроцитах организма-опухоленосителя при экспериментальном раке яичников.	86
<i>Осиков М.В., Огнева О.И.</i> Взаимосвязь между изменением этологического статуса и концентрацией некоторых цитокинов в крови при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиадного освещения.	93
<i>Сабдаш Е.В., Скорняков С.Н., Павлов В.А., Новиков Б.И., Ершова А.В., Егоров Е.А.</i> Активные формы кислорода и высокоактивные соединения азота лейкоцитов крови в механизмах защиты и повреждения при туберкулезе легких.	101

БОЗОРЫ

<i>Пальцын А.А., Комиссарова С.В.</i> Двухъядерные нейроны Пуркинье.	107
<i>Колмычкова К.И., Желанкин А.В., Карагодин В.П., Орехов А.Н.</i> Митохондрии и воспаление.	114
<i>Кожевникова С.А., Будневский А.В., Овсянников Е.С., Малыш Е.Ю., Белов В.Н.</i> Хроническая обструктивная болезнь легких и сахарный диабет: взгляд на эпидемиологию, патогенетические механизмы, лечение.	122
<i>Горкун А.А., Кожина К.В., Зурина И.М., Коселева Н.В., Сабурин И.Н.</i> Патофизиологические и молекулярные механизмы резорбции белков внеклеточного матрикса при старении кожи и пути их восстановления.	128
<i>Онищенко Н.А.</i> Цитогенетическая рекапитуляция, индуцированная медикаментозными препаратами, как универсальный этап формирования срочной защиты органов от повреждения при трансплантации.	134
<i>Матвеева В.Г., Григорьев Е.В.</i> Проблемы и перспективы изучения субпопуляций моноцитов крови в патогенезе заболеваний, связанных с воспалением.	143
<i>Воронков А.В., Мамлеев А.В.</i> Взаимосвязь развития эндотелиальной дисфункции и активности протеинкиназы С при ишемическом повреждении головного мозга.	148
<i>Игнатьева Г.А.</i> Технологии получения вакцинных препаратов: движение от биотехнологических платформ к химическому синтезу антигенных эпитопов, современный взгляд.	154

МЕТОДИКА

<i>Коселева Н.В., Сабурин И.Н., Зурин И.М., Горкун А.А., Борзенков С.А., Никишин Д.А., Колокольцова Т.Д., Устинова Е.Е., Репин В.С.</i> Технология создания мультипотентных сфероидов из мезенхимных стромальных клеток лимба для репарации поврежденных тканей глаза.	160
<i>Шатохина С.Н., Александрин В.В., Кубатиев А.А., Шабалин В.Н.</i> Структуры сыворотки крови в интегральной оценке патофизиологических изменений в организме при экспериментальной ишемии головного мозга.	168
<i>Иванов Ю.Д., Мальсагова К.А., Пleshakova Т.О., Веснин С.Г., Татур В.Ю., Ярыгин К.Н.</i> Мониторинг яркости температуры суспензии клеток фолликулярной карциномы щитовидной железы в СВЧ-диапазоне с помощью радиотермометрии.	174
<i>Иванов А.В., Кучукова М.Ю., Вирус Э.Д., Зурин И.М., Лузянин Б.П., Кубатиев А.А.</i> Исследование гомицистенилирования белков плазмы крови методом капиллярного электрофореза.	178

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

<i>Sergeeva S.P., Shishkina L.V., Litvitskiy P.F., Breslavich I.D., Vinogradov E.V.</i> Structure changes of human brain gray matter neurons and astrocytes in acute local ischemic injury.	4
<i>Krupina N.A., Khlebnikova N.N.</i> Omega-3 polyunsaturated fatty acids when administered to lactating rats modify the development of experimental anxiety-depressive state in the rat pups exposed to the dipeptidyl peptidase-IV inhibitor diprotin A on the second – third weeks after the birth.	9
<i>Kuznetsova L.V., Karpova M.N., Zinkovski K.A., Klishina N.Yu.</i> Anticonvulsant effects of citicoline and diazepam at their combined application on model of the acute generalized convulsions induced by pentylenetetrazole in Wistar rats.	20
<i>Nikitina I.L., Khoduleva Yu.N., Masel A.S., Bairamov A.A., Shabanov P.D.</i> System of KISS-KISS1R: focus on peripheral signaling in androgen-dependent tissues in the experimentally induced model hypogonadotropic hypogonadism.	24
<i>Shakova F.M., Kalinina T.I., Gulyaev M.V., Cheremykh A.M., Yurin V.L., Romanova G.A.</i> Neuroprotective and antiaggregatory effects of mutant molecules of erythropoietin on model of photochemical thrombosis of rat brain prefrontal cortex.	34
<i>Trush V.V., Sobolev V.I.</i> Influence of iatrogenic hypercorticism induced by long-term application of dexamethasone on power of muscular contraction of white rats.	39
<i>Kuznik B.I., Davydov S.O., Stepanov A.V., Morar N.V.</i> The Effect of Kinesitherapy Exercises on the Level of Irisin among Females with Cardio-vascular diseases depending on the body mass and hormonal status.	47
<i>Valeev V.V., Trashkova A.P., Kovaleko A.L., Petrov A.U., Vasilev A.G.</i> Sodium-L-Arginine succinate – a new vasodilating medicine for the treatment and prophylaxis of doxorubicin-induced cardiotoxicity.	52
<i>Gurianov M.I.</i> Organized structure of ventricular fibrillation in dogs with myocardial ischaemia.	58
<i>Zadniptyanyy I.V., Tretiyakova O.S., Sataieva T.P.</i> Cardio- and cytoprotective effect of Cytoflavin in terms of experimental perinatal hemic hypoxia.	64
<i>Matveeva L.V., Mosina L.M.</i> Interrelation secretory activity of stomach and immunes changes of peripheral blood when ulcerogenesis stomach.	72
<i>Tinkov A.A., Gatiatulina E.R., Popova E.V., Polyakova V.S., Skalnaya A.A., Agletdinov E.F., Nikonorov A.A., Radysh I.V., Karganov M.Yu., Skalny A.V.</i> The impact of adipogenic diet on rats' tissue trace elements content.	79
<i>Gening T.P., Dolgova D.R., Abakumova T.V., Antoneeva I.I., Nasyrova E.Yu., Gening S.O.</i> Effects of CAR-regimen autohemochemotherapy on redox-dependent processes in erythrocytes of tumor-bearing organism in experimental ovarian cancer.	86
<i>Osikov M.V., Ogneva O.I.</i> Relationship between the change of ethological status and concentration of certain cytokines in blood in experimental desynchronization under led lighting.	93
<i>Sabadash E.V., Skorniakov S.N., Pavlov V.A., Novikov B.I., Ershova A.V., Egorov E.A.</i> Reactive oxygen species and high-nitrogen compound in the mechanism of protection and damage in white blood cells in pulmonary tuberculosis.	101

REVIEWS

<i>Paltsyn A.A., Komissarova S.V.</i> Binuclear Purkinje neurons.	107
<i>Kolmychkova K.I., Zhelankin A.V., Karagodin V.P., Orekhov A.N.</i> Mitochondria and inflammation.	114
<i>Kozhevnikova S.A., Budnevskiy A.V., Ovsyannikov E.S., Malyshev E.Yu., Belov V.N.</i> Chronic obstructive pulmonary disease and diabetes: a look at the epidemiology, pathogenetic mechanisms, treatment.	122
<i>Gorkun A.A., Kozhina K.V., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Saburina I.N.</i> Pathophysiological and molecular mechanisms of extracellular matrix protein resorption during skin aging, and the ways to their restoration.	128
<i>Onishchenko N.A.</i> Cytogenetic recapitulation, induced by medical preparations, as the universal stage of formation of urgent protection against damage at organ transplantation.	134
<i>Matveeva V.G., Grigoriev E.V.</i> Problems and prospects of investigating monocyte subsets during the development of inflammation-associated diseases.	143
<i>Voronkov A.V., Mamleev A.V.</i> Endothelial dysfunction and Protein kinase C activity development interrelation at ischemic injury of a brain.	148
<i>Ignateva G.A.</i> Vaccine manufacturing and technology: from biotechnological platforms to synthetic epitopes, current viewpoint.	154

METHODS

<i>Kosheleva N.V., Saburina I.N., Zurina I.M., Gorkun A.A., Borzenok S.A., Nikishin D.A., Kolokoltsova T.D., Ustinova E.E., Repin V.S.</i> The technology of obtaining multipotent spheroids from limbal mesenchymal stromal cells for reparation of injured eye tissues.	160
<i>Shatkhina S.N., Aleksandrinn V.V., Kubatiev A.A., Shabalinn V.N.</i> Blood serum structures' integrated assessment of pathophysiological changes in experimental cerebral ischemia.	168
<i>Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Pleshakova T.O., Vesnin S.G., Tatur V.Yu., Yarygin K.N.</i> Monitoring of brightness temperature of suspension of follicular thyroid carcinoma cells in shf range by radiotermometry.	174
<i>Ivanov A.V., Kuchukova M.Yu., Virus E.D., Zurina I.M., Luzyanin B.P., Kubatiev A.A.</i> Application of the capillary electrophoresis method for the study of plasma proteins homocysteinylation.	178

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616.8-092+616.8-005

Сергеева С.П.¹, Шишкина Л.В.², Литвицкий П.Ф.¹, Бреславич И.Д.², Виноградов Е.В.²

Изменения структуры нейронов и астроцитов серого вещества головного мозга при его острой локальной ишемии у человека

¹ — ГБОУ ВПО «Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

² — ФГБУ «Научно-исследовательский институт нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко» Минздрава России, 125047, Москва, 4-я Тверская-Ямская ул., д. 16

Цель исследования. Выявление закономерности изменений структуры нейронов и астроцитов коры головного мозга при его острой локальной ишемии у человека. **Методы.** Образцы тканей головного мозга 9 человек, умерших в результате острого нарушения мозгового кровообращения по ишемическому типу в бассейне левой средней мозговой артерии брали из трех зон: 1 — непосредственно прилежащей к очагу некроза, 2 — отдаленной от нее на 5—10 см, 3 — региона контрлатерального полушария — симметричного очагу ишемии. Срезы окрашивали по Нисслю и гематоксилином-эозином. Непрямым иммунопероксидазным иммуногистохимическим методом выявляли белки GFAP, MAP-2, NSE, p53. **Результаты.** В зоне мозга, непосредственно прилежащей к очагу некроза, выявлены выраженные изменения числа и структуры астроцитов и нейронов, характерные для воспаления. В зоне, граничащей с очагом некротической ткани (в 5—10 см от нее), а также в контрлатеральном полушарии, симметричном очагу ишемии, обнаружены признаки апоптоза нейронов и астроцитов, а также сокращение расстояния между ними. Учитывая данные литературы, можно считать, что указанный феномен является признаком нейропластических процессов, активирующихся в условиях локального ишемического повреждения головного мозга. **Заключение.** Полученные фактические данные свидетельствуют о том, что при локальной ишемии мозга в нем происходят характерные структурные изменения как в области прямого его поражения, так и в ткани контрлатерального полушария. Эти изменения можно расценивать как признак системной активации в мозге нейропластических процессов.

Ключевые слова: нейроны; астроциты; головной мозг; локальная ишемия.

Для цитирования: Сергеева С.П., Шишкина Л.В., Литвицкий П.Ф., Бреславич И.Д., Виноградов Е.В. Изменения структуры нейронов и астроцитов серого вещества головного мозга при его острой локальной ишемии у человека. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 4—8.

Для корреспонденции: Сергеева Светлана Павловна, канд. мед. наук, каф. патофизиологии, ГБОУ ВПО «Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова», e-mail: svetlanapalna@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 01.07.2016

Sergeeva S.P.¹, Shishkina L.V.², Litvitskiy P.F.¹, Breslavich I.D.², Vinogradov E.V.²

Structure changes of human brain gray matter neurons and astrocytes in acute local ischemic injury

¹ — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8-2 Trubetskaya st., Moscow, 119991, Russia

² — N.N. Burdenko Scientific Research Neurosurgery, 16 4th Tverskaya-Yamskaya, Moscow, 125047, Russia

The purpose to identify key morphological features of the Astrocytes and Neurons in the acute local cerebral ischemia human cortex. **Subjects and methods:** Left middle cerebral artery ischemic stroke died persons (n = 9) brain tissue samples from 3 zones: 1st — contiguous to the tissue necrotic damage site zone, 2nd — 5—10 cm distant from the previous one, 3rd — the damage site symmetrical zone of the contralateral hemisphere. For GFAP, MAP-2, NSE, p53 detection indirect immunoperoxidase immunohistochemical staining method has been used. Also, the samples were Nissl and Hematoxylin-Eosin stained. **Results.** The most pronounced changes in the quantity and morphological structure of astrocytes and neurons are found in directly adjacent to the necrotic core region of the left middle cerebral artery ischemic stroke brain. This indicates the prevalence of the inflammation processes around the area of nerve tissue ischemic destruction. Morphological changes of neurons and astrocytes, apoptosis, enhanced neuron-astrocyte interaction found in the area bordering on necrotic core (5—10 cm from it), as well as ischemic hearth symmetrical sites of the contralateral hemisphere. This

interaction is essential for the neuroplasticity realization in the local ischemic brain injury. **Conclusion.** The results obtained were shown the nerve tissue morphological characteristics changes occur in local cerebral cortex ischemic injury not only in the lesion, but also in the contralateral hemisphere. These changes are probably related to the implementation of neuroplasticity.

Keywords: astrocytes; neurons; ischemic injury.

For citation: Sergeeva S.P., Shishkina L.V., Litvitskiy P.F., Breslavich I.D., Vinogradov E.V. Structure changes of human brain gray matter neurons and astrocytes in acute local ischemic injury. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (4): 4—8. (in Russ).

For correspondence: Svetlana P. Sergeeva, MD, PhD, Associate Professor of the Department for Pathophysiology of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8-2 Trubetskaya st., Moscow 119991, Russia; e-mail: svetlanapalna@mail.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Sergeeva S.P., <http://orcid.org/0000-0002-0083-1213>

Breslavich I.D., <http://orcid.org/0000-0002-9321-9102>

Received 01.07.2016

Введение

При повреждении головного мозга одним из наиболее быстро и динамично реагирующих глиальных пулов является астроцитарный, а наиболее уязвимыми элементами — нейроны [1]. В ряде исследований показано, что даже при локальном ишемическом повреждении нейроны подвергаются апоптозу во всех областях головного мозга, хотя и в разной мере. Предполагается, что астроциты непосредственно участвуют в этом процессе [2]. Астроциты, по мнению отдельных исследователей, играют фундаментальную роль в патогенезе повреждений головного мозга, ассоциированных с гибелью нейронов. Тяжесть повреждения нервной ткани связана с невозможностью обеспечения астроцитами эссенциальных метаболических потребностей нейронов [3]. Так, в нормально функционирующей нервной ткани и при ее повреждении астроциты участвуют в регуляции внеклеточного уровня ионов и нейротрансмиттеров, а также в системе антиоксидантной защиты мозга [4], нивелируют токсическое действие избытка глутамата, препятствуя развитию эксайтотоксического каскада [5, 6], обеспечивают восстановление и контроль проницаемости гематоэнцефалического барьера, продуцируют факторы роста [7]. Доказано, что астроциты играют существенную роль в системном ответе организма на повреждение. С учетом этого, именно астроциты являются объектом для поиска воздействий, повышающих выживаемость нейронов и эффективность репаративных процессов в них при повреждении [8, 9].

Цель исследования — выявление закономерности изменений структуры нейронов и астроцитов коры головного мозга при его острой локальной ишемии у человека.

Методика

Образцы ткани головного мозга, взятые при аутопсии 9 человек, чья смерть наступила в период от 2 до 6 сут. после острого нарушения мозгового кровообращения по ишемическому типу в бассейне левой средней мозговой артерии. Аутопсийный материал получали в патологоанатомическом отделении ГКБ № 36 г.Москвы не позднее чем через 24 ч после момента смерти пациента. Работа, в рамках которой проводилось настоящее исследование, одобрена Межвузовским этическим комитетом. В каждом случае образцы ткани брали из 3 зон головного мозга: 1 — прилежащей непосредственно к очагу некротизированной ткани, 2 — отдаленной от предыдущей на 5—10 см, 3 — зоны контрлатерального полушария — симметричной очагу ишемии. Образцы тканей фиксировали в 10%-м забуференном растворе формалина. После отмывания фиксатора в проточной воде выполняли стандартную гистологическую проводку образцов. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм изготавливали на ротационном микротоме Leica RM2125RT (Германия) и размещали их на предметных стеклах с полилизинным покрытием Vision biosystems plus slides (Великобритания).

Выявление белков GFAP, p53, NSE, MAP-2 проводили непрямым иммунопероксидазным методом. Для иммунофенотипирования использовали моноклональные антитела к указанным белкам человека фирмы Vision biosystems novocastra (Великобритания), пероксидазную детекционную систему Peroxidase Detection System for Novocastra производства «Leica Microsystems» (Германия). Визуализация реакции осуществлялась ДАВ-хромогеном. Иммуногистохимические реакции осуществляли согласно прото-

колам, прилагаемым к используемым антителам. Производили высокотемпературную антигенную демаскировку. Для предотвращения эндогенной пероксидазной активности остывшие препараты промывали в растворе ТРИС-буфера (рН 7,54-7,58), обрабатывали 0,3% раствором перекиси водорода на метаноле (1:1). Фоновое контрастирование срезов осуществляли гематоксилином Майера. Полученные препараты изучали с помощью светового микроскопа «Axio Scope A1», Carl Zeiss (Германия) с использованием цифровой фотокамеры «Canon PowerShot», программного обеспечения AxioVision LE, Carl Zeiss (Германия). Контроль специфичности реакции проводили с помощью неиммунной сыворотки, антител к виментину («Dako», Дания). Часть серийных срезов окрашивали кризильным фиолетовым по методу Ниссля и гематоксилином — эозином. С использованием 25-узловой морфометрической сетки (с шагом 10 мкм), вмонтированной в окуляр микроскопа, при увеличении окуляра x10, объектива x90 проводили подсчет нейронов (MAP-2, по Нисслю) и астроцитов (GFAP) с учетом количества их реактивно измененных форм по методу С.Б. Стефанова. Затем вычисляли относительное содержание реактивно измененных нейронов и астроцитов. Вариационно-статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0. Значимыми считали различия при вероятности ошибки $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При изучении срезов, окрашенных по Нисслю и гематоксилином — эозином, при увеличении x100 обнаружено снижение общего количества нейронов и глиальных элементов; отмечены диффузные «запус-

тения» участков коры мозга во всех исследуемых зонах. При этом изменения в зоне 1 были наиболее выражены. Среди выявленных при увеличении (x900) изменений нейронов преобладали гомогенизация и инкрустация цитоплазмы, тигролиз, деформация и сморщивание ядер, кариоцитоллиз с образованием клеток-«теней», хроматолиз, перемещение ядра на периферию клетки и его набухание, смещение ядрышка к периферии ядра; перицеллюлярный отек. Выраженность указанных изменений достигала максимума в зоне 1, однако и в двух других зонах также наблюдались сходные изменения.

Во всех исследованных зонах мозга выявлены признаки нарушения регионарного кровотока: венозная гиперемия и стаз, агрегация эритроцитов и периваскулярный отек. Выраженность указанных изменений была наибольшей в зоне 1. При этом в очаге некроза и в зоне 1 наблюдалась лейкоцитарная инфильтрация. В зонах 2 и 3 изменения были сопоставимы между собой.

При непрямом иммунопероксидажном иммуногистохимическом определении белков GFAP, MAP-2, NSE, p53 в различных зонах мозга при его острой локальной ишемии обнаружены закономерные изменения. В зоне 1 при реакции GFAP выявлено увеличение числа астроцитов, их выраженный интра- и перицеллюлярный отек, набухание и фрагментация их отростков. При реакции MAP-2 и NSE обнаружены признаки гомогенизации цитоплазмы нейронов, их интра- и перицеллюлярный отек, деформация и сморщивание ядер, кариоцитоллиз с образованием клеток-«теней», хроматолиз, набухание и перемещение ядра на периферию клетки. Важно, что в этой зоне, по сравнению с другими, интенсивность окрашивания обоих белков была наименьшей, а количество p53-позитивных клеток — наибольшим.

В зоне 2 выявлены признаки отека как астроцитов, так и нейронов, а также накопление жидкости в перицеллюлярном пространстве. При этом выраженность отека была значительно меньшей, чем в зоне 1. Наблюдалась также тенденция к увеличению числа расположенных периваскулярно астроцитов с признаками их отека и утратой отростков (рис. 1).

В отдельных участках зоны 2 обращает на себя внимание уменьшение расстояния между отдельными группами нейронов и астроцитами по сравнению с другими участками этой зоны (рис. 2). В указанных участках интенсивность окрашивания MAP-2 и NSE отдельных нейронов была более выраженной (рис. 3), а также наблюдалось большее число p53-позитивных клеток в сравнении с участками с менее выраженной нейрон-астроцитарной кооперацией.



Рис. 1. Периваскулярное расположение в зоне 2 астроцитов, их отек, отсутствие отростков (указаны стрелочками). Реакция GFAP, увеличение X200.

В участках мозга зоны 3 также выявлены характерные изменения как в нейронах, так и в астроцитах, однако степень их была меньшей по сравнению с другими зонами. Вместе с тем, в этих участках наблюдались признаки усиления нейрон-астроцитарной кооперации со свойственными для зоны 2 изменениями: уменьшением расстояния между отдельными группами нейронов и астроцитами, большей интенсивностью реакций MAP-2 и NSE в отдельных нейронах, а также обнаружением р53-позитивных клеток.

При морфометрическом анализе при окраске по Нисслю (контроль — MAP-2) выявлено, что относительное содержание морфологически измененных нейронов было наибольшим в зоне 1 (100%) и минимальным в зоне 3 (61%). В зоне 2 содержание нейронов с измененной формой и структурой составило 89%. При реакции GFAP обнаружено, что относительное содержание реактивно измененных астроцитов составило в зоне 1 — 100%, в зоне 2 — 45%, в зоне 3 — 14%. Эти факты позволяют утверждать, что при ишемическом в большей мере, как и при травматическом [1], повреждении мозга наиболее уязвимым элементом нервной ткани являются нейроны. Существует прямая зависимость между степенью и характером морфологических изменений нейронов и астроцитов. Так, в зоне 1, вокруг очага некротически измененной ткани (в условиях гипоксии, субстратного дефицита, лейкоцитарной инфильтрации — что по данным литературы считается признаками воспаления) активированные астроциты и микроглия являются основными продуцентами избытка цитокинов. Известно, что их токсический эффект весьма велик в отношении нейронов прилежащих участков нервной ткани [10], в том числе, судя по нашим данным, и зоны 2.

В зонах 2 и 3 мозга признаком активации адаптивных реакций можно считать более выраженную реакцию MAP-2 и NSE отдельных нейронов. Показано, что MAP-2 играет важную роль в развитии пластических процессов в дендритах нейронов, обеспечивая, в том числе, и изменения в синаптическом аппарате [11]. Иммуноцитохимическая реакция на NSE (2-фосфо-D-глицерат гидролаза) считается индикатором нейрональной активности. Показано, что повышение интенсивности метаболизма в нейронах сопровождается увеличением активности этого фермента в их цитоплазме [12]. В зонах 2 и 3 мозга, где наблюдались описанные выше процессы, отмечалось также максимальное количество р53-позитивных клеток. В этих клетках выявлена повышенная степень прокрашивания участков локализации фермента NSE, из чего можно сделать заключение, что эти клетки представляют собой именно нейроны. Мы полагаем, что они, по каким-либо причинам, не способ-

ны к реализации процессов нейропластичности и элиминируются в связи с активацией апоптоза. На дублирующих срезах при реакции GFAP наблюдаются признаки усиленной кооперации нейронов и астроцитов. В связи с этим, а также учитывая данные литературы [9, 13—15], можно сделать вывод о непосредственном участии астроцитов в реализации указанных процессов.

Таким образом, зоне мозга, непосредственно прилежащей к очагу ишемического некроза в наибольшей мере выражены изменения числа и структуры астроцитов и нейронов, свойственные для воспаления. В зоне мозга, граничащей с очагом некротической ткани (в 5—10 см от нее), а также в отдаленных от нее участках контрлатерального полушария, симметричной

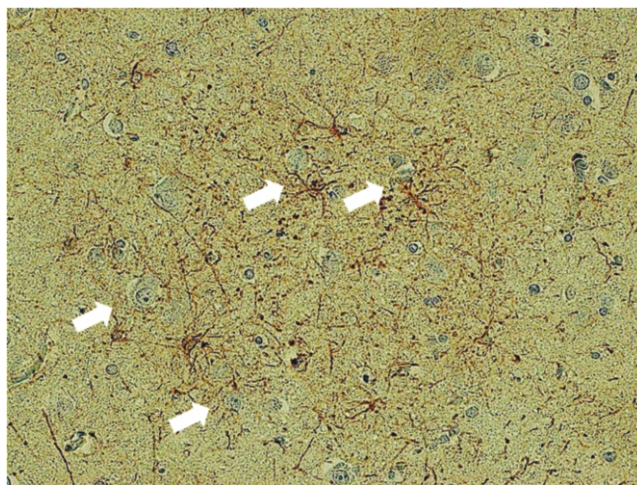


Рис. 2. Уменьшение расстояния между астроцитами и нейронами в зоне 2 (указаны стрелочками). Реакция GFAP, увеличение X400.

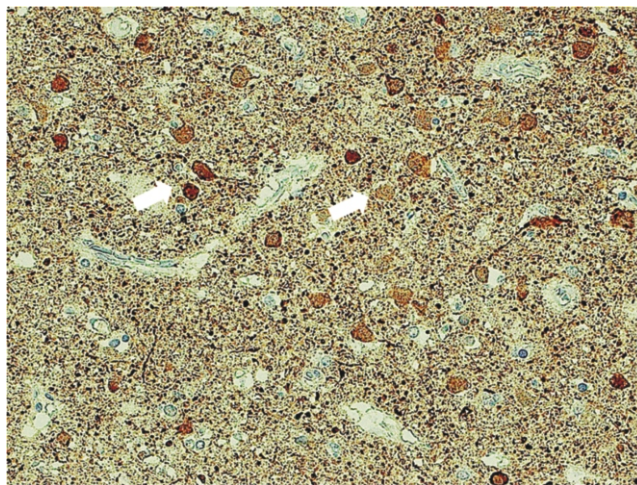


Рис. 3. Неравномерная интенсивность реакции MAP-2 в зоне 2 (указаны стрелочками два нейрона с разной интенсивностью реакции). Реакция MAP-2, увеличение X400.

очагу ишемии, развиваются характерные изменения структуры нейронов и астроцитов (их набухание и отек периецеллюлярного пространства, утрата отростков астроцитов), активируется процесс их апоптоза, наблюдается сокращение расстояния между нейронами и астроцитами. Учитывая это, а также данные литературы, есть основания допускать, что сближение нейронов и астроцитов в обеих указанных зонах мозга при его локальной ишемии является одним из признаков активации, в этих условиях, нейропластических процессов в нем. Нейроны, неспособные к такой перестройке, элиминируются путем апоптоза.

References

1. Floyd., Candace L., and Bruce G. Lyeth. Astroglia: important mediators of traumatic brain injury. *Progress in brain research* 2007; 161: 61-79.
2. Ouyang Y.B., Voloboueva L.A., Xu L.J., Giffard R.G. Selective dysfunction of hippocampal CA1 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia. *The Journal of neuroscience*. 2007 Apr 18; 27(16): 4253-60.
3. Greve M.W., Zink B.J. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*. 2009; 76(2): 97-104.
4. Dringen R., Gutterer J.M., Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain. *European Journal of Biochemistry*. 2000; 267(16): 4912-6.
5. Schousboe A., Waagepetersen H.S. Glial modulation of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. *Current topics in medicinal chemistry*. 2006; 6(10): 929-34.
6. Miao Y., Qiu Y., Lin Y., Miao Z., Zhang J., Lu X. Protection by pyruvate against glutamate neurotoxicity is mediated by astrocytes through a glutathione-dependent mechanism. *Molecular biology reports*. 2011; 38(5): 3235-42.
7. Chen Y., Swanson R.A. Astrocytes and brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2003; 23(2): 137-49.
8. Sofroniew M.V., Vinters H.V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*. 2010; 119(1): 7-35.
9. Dhandapani K.M., Hadman M., De Sevilla L., Waide M.F., Mahesh V.B., Brann D.W. Astrocyte Protection of Neurons role of transforming growth factor- β signaling via a c-jun-ap-1 protective pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(44): 43329-39.
10. Kaur G., Han S.J., Yang I., Crane C. Microglia and central nervous system immunity. *Neurosurgery Clinics of North America*. 2010; 21(1): 43-51.
11. Johnson G.V., Jope R.S. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. *Journal of neuroscience research*. 1992; 33(4): 505-12.
12. Yardimoglu M., Ilbay G., Dalcik C., Dalcik H., Ates N. Immunocytochemistry of neuron specific enolase (NSE) in the rat brain after single and repeated epileptic seizures. *International Journal of Neuroscience*. 2009; 118(7): 981-93.
13. Verkhatsky A., Nedergaard M., & Hertz L. Why are astrocytes important? *Neurochemical research*. 2015;40(2): 389-401.
14. Haydon P.G., Nedergaard M. How do astrocytes participate in neural plasticity? *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015; 7(3): a020438.
15. Choudhury G.R., & Ding S. Reactive astrocytes and therapeutic potential in focal ischemic stroke. *Neurobiology of disease*. 2016; 85; 234-44.

Сведения об авторах:

Шишкина Людмила Валентиновна, канд. мед. наук, патологоанатомическое отделение, ФГБУ «НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, e-mail: lshishkina@nsi.ru

Литвицкий Петр Францевич, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, каф. патофизиологии, ГБОУ ВПО «Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова», e-mail: litvicki@mma.ru

Бреславич Илья Дмитриевич, патологоанатомическое отделение, ФГБУ «НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России

Виноградов Евгений Викторович, патологоанатомическое отделение, ФГБУ «НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616-092.9

Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н.

Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты при введении кормящим крысам изменяют развитие экспериментального тревожно-депрессивного состояния у крысят, подвергнутых действию дипротина А на второй — третьей неделях после рождения

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

Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) относятся к группе гиполипидемических препаратов, проявляют свойства антиоксидантов и применяются в клинике для вторичной профилактики ряда заболеваний. Исследуются эффекты омега-3 ПНЖК на течение стресс-индуцированных и эндогенных депрессивных состояний. Ранее нами показано, что синтетические ингибиторы пролилэндопептидазы (ПЭП; ЕС 3.4.21.26) проявляют свойства антидепрессантов на разных экспериментальных моделях эмоционально-мотивационных расстройств. Известно, что омега-3 ПНЖК являются ингибиторами ПЭП. **Цель** настоящей работы — изучение влияния препарата Омакор (Abbot, Германия), содержащего омега-3 ПНЖК, в условиях его введения кормящим крысам Вистар, на эмоционально-мотивационное поведение потомства с экспериментальным тревожно-депрессивным состоянием, вызванным действием ингибитора дипептидилпептидазы IV (ДПП-IV; CD 26; ЕС 3.4.14.5) дипротина А в постнатальные дни (ПНД) 5—18 (вторая — третья недели постнатального развития). **Методика.** Использованы общепринятые методы оценки эмоционально-мотивационного поведения животных и сенсомоторной реактивности. Омега-3 ПНЖК вводили крысам в период лактации перорально в дозе 0,3 г/кг в течение 28 дней, начиная со следующего после родов дня. Дипротин А вводили системно в дозе 2 мг/кг. **Результаты.** Омега-3 ПНЖК в условиях их приема крысами-самками в период вскармливания предотвращали развитие депрессивноподобного поведения у крысят подросткового возраста, подвергнутых неонатальному действию ингибитора ДПП-IV дипротина А, и способствовали формированию антидепрессивного фенотипа у крысят контрольной группы. Однако в указанных условиях омега-3 ПНЖК увеличивали тревожность и не предотвращали повышение агрессивности у крысят с экспериментальным тревожно-депрессивным состоянием, а также повышали тревожность и провоцируемую стрессом агрессивность у контрольных крысят. **Заключение.** Результаты работы поддерживают гипотезу об участии пролинспецифических пептидаз ДПП-IV и ПЭП в механизмах развития эмоционально-мотивационных нарушений и расширяют представления о спектре действия омега-3 ПНЖК.

Ключевые слова: омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, ингибитор дипептидилпептидазы-IV, дипротин А, экспериментальное тревожно-депрессивное расстройство, крысы.

Для цитирования: Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н. Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты при введении кормящим крысам изменяют развитие экспериментального тревожно-депрессивного состояния у крысят, подвергнутых действию дипротина А на второй — третьей неделях после рождения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 9—19.

Для корреспонденции: Крупина Наталья Александровна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: krupina-na@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

Благодарность. Авторы выражают благодарность научному сотруднику ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи» Н.В. Трусову за консультации по методике применения препарата Омакор в эксперименте.

Поступила 11.10.2016

Krupina N.A., Khlebnikova N.N.

Omega-3 polyunsaturated fatty acids when administered to lactating rats modify the development of experimental anxiety-depressive state in the rat pups exposed to the dipeptidyl peptidase-IV inhibitor diprotin A on the second — third weeks after the birth

Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8 Baltiyskaya Str., Moscow 125315, Russia

Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) belong to the hypolipidemic drugs, exhibit antioxidant properties and are used in the clinic for secondary prevention of several diseases. The effects of omega-3 PUFAs on the course of the stress-induced and endogenous depression are under investigation. We have previously demonstrated that synthetic inhibitors of prolyl endopeptidase (PEP; EC 3.4.21.26) exhibit antidepressant-like properties in different experimental models of emotional and motivational disorders. It is known that omega-3 PUFAs show PEP inhibitory activity. **The purpose** of this work was to study the effects of the drug Omacor (Abbot, Germany) containing omega-3 PUFAs, when administered to the lactating Wistar rats, on the emotional and motivational behavior of the offspring with the experimental anxiety-depressive disorder caused by the inhibitor of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV; CD 26; EC 3.4.14.5) diprotin A on postnatal day (PND) 5–18 (second — third weeks of postnatal development). **Methods.** We used conventional methods of assessing the emotional and motivational behavior and sensorimotor reactivity in animals. Omega-3 PUFAs were administered to lactating rats at a dose 0.3 g / kg, per os, for 28 days starting from the next day after the birthing. Diprotin A was administered systemically at a dose of 2 mg/kg. **Results.** Omega-3 PUFAs when administered to the lactating females, prevented the development of depressive-like behavior in adolescent rats neonatally exposed to DPP-IV inhibitor diprotin A, and contributed to the formation of antidepressive phenotype in control rats. However, under these circumstances, the omega-3 PUFAs increased anxiety and did not prevent an increase in aggression in rats with the experimental anxiety-depressive disorder and increased anxiety and stress-provoked aggression in the controls. **Conclusion.** The results support the hypothesis on the involvement of proline-specific peptidases DPP-IV and PEP in the mechanisms of emotional and motivational disturbances and expand the spectrum of omega-3 PUFAs action.

Keywords: omega-3 polyunsaturated fatty acids; inhibitor of dipeptidyl peptidase-IV, diprotin A, experimental anxiety-depressive disorder, rats.

For citation: Krupina N.A., Khlebnikova N.N. Omega-3 polyunsaturated fatty acids when administered to lactating rats alter the development of experimental anxiety-depressive state in the rat pups exposed to the dipeptidyl peptidase-IV inhibitor diprotin A on the second — third weeks after the birth. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (4): 9–19. (in Russ).

For correspondence: Nataliya N. Krupina, Doctor of Biological Sciences, Principal Researcher, «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»; 8 Baltiyskaya Str., Moscow 125315, Russian Federation, e-mail: krupina-na@yandex.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Acknowledgments. We thank Dr. N.V. Trusov from the Federal State Budgetary Institution of Science «Federal Research Centre of food, biotechnology and food safety», Moscow, Russia, who kindly consulted us on the method of application of the drug Omacor in the experiment.

Information about authors: Krupina N.A., <https://orcid.org/0000-0002-2462-899X>

Received 11.10.16

Введение

В последнее время много внимания уделяется изучению связи нарушений диеты, в частности, потребления омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), с состоянием нервно-психического здоровья [1]. Омега-3 ПНЖК, относящиеся к группе гиполипидемических препаратов, не только используются для вторичной профилактики инфаркта миокарда [2], коррекции эндогенной гипертриглицеридемии [3] и лечения сахарного диабета [4], но, проявляя свойства антиоксидантов, являются эссенциальным

компонентом клеточной мембраны и относятся к ключевым факторам регуляции нейромедиации, нейротенеза, ответа на стресс, нейровоспаления и эмоционального состояния [5]. Омега-3 ПНЖК играют важную роль в пре- и неонатальном развитии ЦНС, вносят вклад в становление когнитивной деятельности у детей и поддержание когнитивных функций у взрослых и стареющих особей [6]. В целом, признано, что омега-3 ПНЖК важны для сохранения психического здоровья и могут быть полезны для профилактики психопатологии. Однако до сих пор

многое остается неясным. Исследования эффектов омега-3 ПНЖК на течение стресс-индуцированных и эндогенных депрессивных состояний продолжаются [7—9].

Известно, что омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты являются ингибиторами пролилэндопептидазы (ПЭП, ЕС 3.4.21.26) [10]. В наших предыдущих работах показано, что синтетический ингибитор ПЭП бензилоксикарбонил-метионил-2(S)-цианопириролидин проявляет свойства антидепрессанта на разных моделях экспериментальных депрессивных и тревожно-депрессивных состояний [11—14], в том числе, на модели смешанного тревожно-депрессивного состояния, индуцированного у крыс подросткового возраста и взрослых особей действием синтетического ингибитора дипептидилпептидазы-IV (ДПП-IV, ЕС 3.4.14.5) метионил-2(S)-цианопириролидина на второй — третьей неделях постнатального развития. Недавно нами была разработана новая модель тревожно-депрессивного расстройства с сопутствующей скрытой агрессивностью у крыс, вызываемая путем введения крысам в раннем постнатальном периоде другого ингибитора ДПП-IV — трипептида дипротина А [15], являющегося, помимо прочего, субстратом данного фермента.

Цель настоящей работы заключалась в изучении эффектов омега-3 ПНЖК на эмоционально-мотивационное поведение крыс на модели экспериментального тревожно-депрессивного состояния, индуцированного неонатальным действием дипротина А. Проверено предположение о том, что добавление омега-3 ПНЖК в диету крыс-самок в период лактации может корректировать психоэмоциональные нарушения у потомства.

Методика

Работа проведена на 10 крысах-самках и их потомстве — 55 крысах-самцах популяции Вистар, выращенных в питомнике ФГБНУ «НИИОПП». Все процедуры проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г.

Крыс-самок после родов содержали вместе с потомством мужского пола (4—6 детенышей в помете) в стандартных условиях вивария с естественной смесью освещенности при свободном доступе к пище и воде. День родов считали нулевым постнатальным днем (ПНД). Начиная со следующего дня, кормящие самки опытной группы в течение 28 дней, вдобавок к стандартному рациону, получали раствор омега-3 ПНЖК перорально, один раз в сутки, в дозе 0,3 г/кг (препарат ОМАКОР, производитель —

Баннер Фармакапс Юроп Б.В., Нидерланды, выпускающий контроль качества — Abbott Products GmbH, Германия; содержит омега-3 ПНЖК: этиловый эфир эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) и этиловый эфир докозагексаеновой кислоты (ДГК) в соотношении 1,2:1, а также альфа-токоферол). Доза омега-3 ПНЖК с учетом коэффициента конверсии доз [16] соответствовала дозе 2,8 г для человека весом 60 кг, что соответствует рекомендованным для клинического применения дозам [17]. Для достижения требуемого объема препарат разводили в подсолнечном масле (ПМ) марки «Олейна», в состав которого входят насыщенные жирные кислоты и витамин Е. Контрольные самки для поддержания состава и калорийности дневного рациона получали по той же схеме в том же объеме ПМ, обогащенное альфа-токоферолом для достижения дозы витамина Е, соответствовавшей дозе, которую получали самки опытной группы. Половине детенышей крыс-самок опытной и контрольной групп в период с 5-го по 18-й ПНД включительно внутривентриально вводили дипротин А в дозе 2 мг/кг, оставшимся крыскам вводили физиологический раствор (ФР). На 29-й день после рождения крысят отделяли от матерей и помещали в клетки, сохраняя состав помета. Были сформированы 4 группы крыс: «Омега-3 ПНЖК + дипротин А» (n = 15), «Омега-3 + ФР» (n = 14), «ПМ + дипротин А» (n = 14) и «ПМ + ФР» (n = 12, контроль). Исследование поведения проводили у животных в возрасте 1 и 2 мес.

Оценка

ориентировочно-исследовательской активности

Двигательную (горизонтальную) и исследовательскую (вертикальную) активность крыс оценивали в тесте автоматизированного «открытого поля» в системе «Opto-Varimex» («Columbus Instruments», США) по специализированной программе «Auto-Track». В звукоизолированной комнате с уровнем освещенности 42 люкса в течение 3 мин поминутно, а также суммарно за 3 мин наблюдения оценивали двигательную активность по длине пройденного пути в см, исследовательскую — по числу стоек. После каждого тестирования клетки тщательно мыли и проводили дезодорацию раствором этилового спирта.

Оценка уровня тревожности

Исследование уровня тревожности крыс в поднятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) проводили с помощью системы видеотрекинга VideoMot2 для автоматической видеорегистрации и анализа поведения грызунов со специализированным программным обеспечением и параллельной записью цифро-

вого видео по каждому животному на жесткий диск ПК в ходе эксперимента (TSE Systems GmbH, Germany).

Лабиринт из черного непрозрачного поливинилхлорида расположен на высоте 70 см от пола, имеет 2 открытых (не имеющих стенок) рукава (42 x 14 см) (ОР) и 2 закрытых стенками рукава (42 x 14 x 22 см) (ЗР), перпендикулярных друг другу, площадка в центре (Ц) имеет размеры 14 x 14 см; ОР имеют низкие бортики (1 см) для предотвращения падения животного. Обследование проводили при приглушенном верхнем свете, освещенность в центре лабиринта составляла 29 лк, в ОР — 36 лк, в ЗР — 2 лк. Крысу сажали в центр лабиринта мордой в сторону ОР, длительность теста составляла 5 мин. Фиксировали поведение животного по следующим параметрам:

- 1) время в ОР (мс, суммарно по двум ОР);
- 2) число посещений ОР (сумма числа заходов в оба ОР);
- 3) пробег в ОР (см, сумма по двум ОР);
- 4) время в ЗР (мс, суммарно по двум ЗР);
- 5) число посещений ЗР (сумма числа заходов в оба ЗР);
- 6) пробег в ЗР (см, сумма по двум ЗР);
- 7) общий пробег за время тестирования (см);
- 8) средняя скорость перемещения (см/с).

Рассчитывали предпочтение ОР и ЗР (% числа посещений ОР или ЗР от суммарного числа заходов в ОР + ЗР). В ПКЛ также оценивали стойки, которые, как правило, характеризуют исследовательскую активность, груминг, характеризующий эмоциональное напряжение, и свешивания из ОР (включая заглядывания за край ОР, — так называемые «сканирования»), которые расцениваются как поведение оценок риска у грызунов, а увеличение числа свешиваний из ОР интерпретируется как показатель снижения тревожности [18]. Для каждого из данных показателей оценивали число, суммарную длительность (мс) и латентное время первого появления (мс).

Оценка депрессивноподобного поведения

Оценку поведения проводили по методу Порсолта в модификации, как описано в работе [19]. Для тестирования крыс помещали в цилиндрический пластмассовый бак (высота 47 см, внутренний диаметр 35 см), заполненный водой на высоту 35 см, температура воды составляла 25—26°C. Фиксировали число и длительность периодов активного плавания (энергичные движения всеми лапами с активным перемещением и/или попыткой выбраться), пассивного плавания (слабые гребки одной-двумя лапами, необходимые для поддержания тела на плаву) и иммобильности (отсутствие плавательных движений). Рассчиты-

вали ритмологический индекс депрессивности (ИД) по отношению числа самых коротких периодов иммобильности (до 6 с) к общему числу периодов активного плавания [15]. Длительность тестирования составляла 10 мин.

Оценка зоосоциального взаимодействия

Социальное взаимодействие оценивали в незнакомой крысам клетке из плексигласа (37,0 x 57,0 x 19,0 см) при красном свете, освещенность над центром клетки составляла 7 лк. По схеме эксперимента крысы в течение двух-трех дней до тестирования находились в клетках поодиночке. В течение 15 мин теста оценивали частоту и длительность активных неагрессивных и агрессивных социальных контактов. К активным неагрессивным социальным контактам относили обнюхивание, социальный груминг, залезание под или налезание на партнера, преследование, не заканчивавшееся проявлением агрессии. К агрессивным контактам относили преследование, переходящее в агрессивное взаимодействие, атаки/драки, укусы, агрессивный груминг (выкусывание/выгрызание шерсти партнера). Для характеристики взаимодействия использовали показатели латентности, суммарного числа и времени активных неагрессивных и агрессивных контактов.

У крыс в возрасте 1 мес. оценивали поведение в парах, состоявших из животных одной группы — опытной или контрольной. Животные в парах не были знакомы друг с другом, так как были выбраны из разных пометов, содержавшихся в разных клетках. Различие в весе составляло не более 10—15%. У взрослых крыс в возрасте 2 мес. пары были сформированы по другому принципу, так как не было возможности подобрать достаточное количество пар незнакомых друг с другом животных, относящихся к одной группе. В каждую пару входила крыса из экспериментальной или опытной группы и соответствовавшая ей по весу интактная крыса, которую не подвергали никаким воздействиям в раннем постнатальном периоде, но содержали изолированно от других особей за 2—3 дня до тестирования. В этом случае за поведением каждого из животных во время тестирования наблюдали индивидуально. После каждой пары клетку тщательно мыли и проводили дезодорацию этиловым спиртом.

Оценка привыкания

и сенсомоторной реактивности по показателям акустического стартл-рефлекса у крыс

Модульная установка «Coulbourn Instruments» (США), которую использовали для автоматизированной оценки привыкания и сенсомоторной реактивности по характеристикам акустического стартл-отве-

та (АСО), а также принцип измерения подробно описаны ранее [19]. Максимальную амплитуду (А) АСО определяли в течение 200-мс интервала с момента подачи сигнала и выражали в условных граммах (усл. г). Оценку характеристик АСО и кратковременного привыкания (негативного обучения) проводили в одной экспериментальной сессии по специальной программе, включавшей последовательно 121 сигнал для оценки привыкания, и далее, без дополнительного перерыва, 40 сигналов для оценки сенсомоторной реактивности, в соответствии с методическими рекомендациями [20].

Для оценки кратковременного привыкания (в течение одной экспериментальной сессии) крысам после пятиминутного адаптационного периода предъявляли серию из 121 акустического сигнала в виде всплеск белого шума с уровнем звука 120 дБ (сверхпороговая величина раздражителя), длительность каждой составляла 20 мс, крутизна нарастания — 2 мс. Фиксированный интервал между всплесками составлял 10 с. Общая длительность тестирования составляла 25,2 мин. Время принудительной вентиляции камеры после каждой попытки — 5 с. Для каждого животного рассчитывали среднюю величину А АСО на 120 предъявленных сигналов A_{cp-120} (исключая ответ на первый сигнал вследствие его большой вариативности). Все ответы группировали в 12 последовательных блоков по 10 ответов в каждом, рассчитывали A_{cp} по каждому блоку в каждой группе. Привыкание крыс в течение сессии оценивали по динамике снижения A_{cp} от 1-го блока к последнему. Относительное изменение амплитуды АСО в каждом блоке рассчитывали как $[A_{cp}(\text{блок}_n) / A_{cp}(\text{блок}_1) * 100\%]$ — 100%, где n — номер блока, $A_{cp}(\text{блок}_1)$ — величина амплитуды в блоке 1, принятая за 100%. В соответствии с методом расчета 0% относительного изменения А АСО означал отсутствие различий между A_1 и A_n и отсутствие привыкания (всегда в блоке 1); отрицательные значения характеризовали выраженность относительного снижения АСО в блоках, собственно выраженность привыкания, положительные значения или отсутствие статистически значимого относительного снижения А АСО свидетельствовало о нарушении привыкания.

Сенсомоторную реактивность в акустическом стартл-рефлексе оценивали по показателю А АСО на сверхпороговый раздражитель. Предстимульное торможение (ПСТ), отражающее величину снижения АСО на сверхпороговый раздражитель в случае, если ему предшествует подпороговый сигнал той же или иной модальности, оценивали по следующей формуле: $\text{ПСТ}\% = 100\% - A_x/A_{осн} * 100\%$; где $A_{осн}$ — А АСО на сверхпороговый сигнал, принятая за 100%; A_x — А АСО на сигнал, которому предшествовал

предстимул (модулирующий сигнал) подпороговой интенсивности, x — интенсивность предстимула. В настоящей работе оценивали АСО на 40 сигналов четырех типов: сверхпороговый стимул (120 дБ), и 3 комбинации предстимулов подпороговой величины, не достаточной для вызова реакции вздрагивания (73, 75 и 80 дБ), с последующим сверхпороговым стимулом. Интервал между предстимулом и стимулом составлял 100 мс, интервалы между сигналами четырех типов были рандомизированы и составляли в среднем 15 с (от 10 до 20 с). Каждый тип сигнала предъявляли по 10 раз в случайном порядке таким образом, чтобы не было двух одинаковых следующих друг за другом сигналов. Время принудительной вентиляции камеры после каждой попытки составляло 7 с. Длительность этой части сессии составляла 11 мин. Для каждого животного и затем для группы в целом рассчитывали ПСТ по всем попыткам одного типа. Затем рассчитывали средние величины ПСТ_{ср} по всем типам сигналов. Тестирование проводили однократно у крыс в возрасте 2 мес.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных проводили по алгоритмам программы «Statistica For Windows 7.0». По результатам предварительной проверки гипотезы о нормальном характере распределения данных по тестам Колмогорова—Смирнова и Лиллиефорса в случае, если гипотезу не отклоняли, применяли параметрические методы анализа, если гипотезу отклоняли — непараметрические методы. В работе использовали параметрический двухфакторный дисперсионный анализ Two-Way ANOVA, однофакторный дисперсионный анализ One Way ANOVA, параметрический дисперсионный анализ для повторных измерений Repeated Measures ANOVA с последующим множественным попарным сравнением средних в выборках по тесту Ньюмана—Кеулса. Также применяли непараметрический U-критерий Манна—Уитни для независимых переменных. Принятый уровень значимости составлял 5%. Если достигнутый уровень статистической значимости превышал критическое значение, принималась нулевая гипотеза. Данные представлены в виде $M \pm S.E.M$, где M — среднее, m — стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

Вес животных в возрасте 1 мес. не различался и составил в группах «Омега-3 ПНЖК + дипротин А», «Омега-3 + ФР», «ПМ + дипротин А» и «ПМ + ФР» соответственно $141,3 \pm 4,2$, $140,8 \pm 5,3$, $150,8 \pm 8,2$ и $127,4 \pm 7,4$ г. В возрасте 2 мес. вес животных в группах «Омега-3 ПНЖК +

дипротин А», «Омега-3 + ФР», «ПМ + дипротин А» и «ПМ + ФР» составил соответственно $231,1 \pm 9,2$, $240,6 \pm 4,2$, $237,4 \pm 10,1$ и $199,7 \pm 11,9$ г. В группе «ПМ + ФР» средний вес крыс был ниже, чем в остальных группах, однако статистически значимого влияния факторов «Омега-3 ПНЖК» или «Дипротин А» на показатель веса животных не было выявлено: по результатам двухфакторного анализа Two-Way ANOVA соответственно, $F = 2,559$, $p = 0,116$ и $F = 1,847$, $p = 0,180$.

Ориентировочно-исследовательская активность

По результатам двухфакторного анализа Two-Way ANOVA у крысят в возрасте 1 мес. выявлено влияние фактора «Дипротин А» на двигательную и исследовательскую активность: $F = 6,679$, $p = 0,012$ и $F = 8,983$, $p = 0,004$ соответственно. Постнатальное действие дипротина А приводило к снижению двигательной и исследовательской активности у крыс независимо от того, получали ли они с молоком матери омега-3 ПНЖК или ПМ (табл. 1). Также выявлено влияние фактора «Омега-3 ПНЖК» на исследовательскую активность крыс: $F = 8,055$, $p = 0,006$. Омега-3 ПНЖК, полученные с молоком матери, оказывали угнетающее действие на исследовательскую активность крыс подросткового возраста независимо от того, подвергались ли животные действию дипротина А или ФР на второй-третьей неделях постнатального развития. Взросление сопровождалось снижением исследовательской активности у крыс контрольной группы «ПМ + ФР».

Уровень тревожности

У крыс-подростков, вскормленных матерями, которые принимали в период лактации ПМ, дипротин А вызывал повышение уровня тревожности (табл. 2):

в группе «ПМ + дипротин А» число посещений ОР и их предпочтение были снижены, а предпочтение ЗР, напротив, увеличено в сравнении с животными группы «ПМ + ФР». Отмечена выраженная тенденция к снижению пробега в ОР. Животные в группе «Омега-3 ПНЖК + ФР» также были более тревожны, чем крысы группы «ПМ + ФР», так как демонстрировали снижение посещения и предпочтение ОР, снижение пробега в ОР одновременно с увеличением предпочтения ЗР и увеличением в них пробега. У потомства крыс-матерей, получавших в период лактации препарат омега-3 ПНЖК, уровень тревожности в группах, подвергавшихся постнатальному действию дипротина А и ФР, не различался. Данные свидетельствуют о том, что в случае приема препарата омега-3 ПНЖК кормящими самками у здорового потомства в процессе взросления может повышаться уровень тревожности. В результате не выявляются отличия между животными групп «Омега-3 ПНЖК + дипротин А» и «Омега-3 ПНЖК + ФР». Однако у животных группы «Омега-3 ПНЖК + дипротин А» посещение и предпочтение ОР было ниже, а скорость перемещения меньше, чем в группе «ПМ + дипротин А», то есть введение омега-3 ПНЖК лактирующим самкам не только не защищало крысят подросткового возраста от анксиогенного действия дипротина А, но, напротив, усиливало такое действие.

У взрослых двухмесячных крыс в группе «ПМ + дипротин А» тревожность была ниже, чем в контрольной группе «ПМ + ФР» и в группе «Омега-3 ПНЖК + дипротин А», о чем свидетельствовал рост показателей посещения и предпочтения ОР наряду со снижением предпочтения ЗР (табл. 3). В группе «Омега-3 ПНЖК + дипротин А» общий пробег и средняя скорость перемещения в ПКЛ были ниже, чем в группе «ПМ + дипротин А». Животные в груп-

Таблица 1

Показатели двигательной и исследовательской активности в тесте автоматизированного открытого поля у крыс, подвергнутых действию дипротина А или ФР в период с 5-го по 18-й постнатальные дни и вскормленных крысами-самками, получавшими омега-3 ПНЖК или ПМ в период лактации

Показатели	Группы крыс							
	Омега-3 ПНЖК + дипротин А		Омега-3 ПНЖК + ФР		ПМ + дипротин А		ПМ + ФР	
	1 мес. (n = 15)	2 мес. (n = 15)	1 мес. (n = 14)	2 мес. (n = 13)	1 мес. (n = 14)	2 мес. (n = 14)	1 мес. (n = 12)	2 мес. (n = 12)
Двигательная активность, см	$917,5 \pm 82,0$ +	$940,5 \pm 88,0$	$1153,7 \pm 60,1$	$966,5 \pm 95,4$	$1012,0 \pm 77,9$	$1013,0 \pm 98,1$	$1172,2 \pm 88,2$	$957,4 \pm 138,6$
Исследовательская активность (число стоек)	$15,4 \pm 1,1$ *	$15,9 \pm 1,4$	$18,1 \pm 1,2$	$17,8 \pm 1,7$	$17,9 \pm 1,4$ *	$16,3 \pm 1,3$	$23,4 \pm 1,6$	$16,3 \pm 1,5$ #

Примечание. * — по сравнению со значением показателя в соответствующей контрольной группе, $p < 0,05$ (post hoc анализ по тесту Ньюмана—Кеулса после One-Way ANOVA); + — по сравнению со значением показателя в соответствующей контрольной группе, $p < 0,09$; # — по сравнению со значением показателя в той же группе на предыдущем сроке обследования, $p < 0,05$ (Repeated Measures ANOVA); n — число животных в группе

пе «Омега-3 ПНЖК + ФР» не отличались от крыс в группе «ПМ + ФР» по показателям активности в ОР, однако демонстрировали снижение общего пробега, пробега в ЗР, а также снижение скорости перемещения. Полученные данные свидетельствуют о том, что омега-3 ПНЖК, полученные с молоком матери, оказывали тормозящее действие на двигательную активность взрослых крыс. Кроме того, омега-3 ПНЖК нивелировали анксиолитический эффект дипротина А, выявленный у взрослых крыс. Такие изменения в по-

ведении потомства свидетельствуют о наличии отсроченного влияния приема омега-3 ПНЖК кормящими самками на поведение потомства.

У крыс подросткового возраста в группе «ПМ + дипротин А» было снижено число свешиваний из ОР ($9,3 \pm 1,9$ в группе «ПМ + дипротин А» по сравнению с $19,2 \pm 1,5$ в группе «ПМ + ФР»; $p < 0,05$) в сочетании с увеличением латентного периода свешивания ($50769,1 \pm 20282,3$ мс в группе «ПМ + дипротин А» по сравнению с $14530,4 \pm 3811,4$ мс в груп-

Таблица 2

Показатели тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у крыс, подвергнутых действию дипротина А или ФР в период с 5-го по 18-й постнатальные дни и вскормленных крысами-самками, получавшими омега-3 ПНЖК или ПМ в период лактации. Возраст крыс — 1 мес.

Группа	ОР, время (мс)	ОР, посещения (число)	ОР, пробег (см)	ОР, предпочтение (%)	ЗР, время (мс)	ЗР, посещения (число)	ЗР, пробег (см)	ЗР, предпочтение (%)	Общий пробег (см)	Средняя скорость перемещения (см/с)
Омега-3 ПНЖК + дипротин А	$43258,4 \pm 10285,04$ +	$4,3 \pm 0,6$	$280,9 \pm 51,8$ *	$26,4 \pm 3,6$ +	$186786,9 \pm 11601,4$ *	$9,6 \pm 0,8$	$1040,2 \pm 41,7$	$73,6 \pm 3,6$ +	$1919,8 \pm 115,4$ *	$6,4 \pm 0,4$ *
Омега-3 ПНЖК + ФР	$52326,1 \pm 8898,3$ #	$5,3 \pm 0,8$ #	$417,3 \pm 70,0$ #	$33,0 \pm 3,3$ #	$176185,5 \pm 14492,9$ #	$9,9 \pm 0,9$	$1040,4 \pm 53,0$ #	$67,0 \pm 3,3$ #	$2036,7 \pm 137,2$	$6,8 \pm 0,5$
ПМ + дипротин А	$79042,4 \pm 16990,5$	$5,7 \pm 0,8$ #	$547,1 \pm 78,9$ x	$36,3 \pm 5,1$ #	$129746,1 \pm 15696,8$	$10,2 \pm 1,1$	$1025,7 \pm 119,4$	$63,7 \pm 5,1$ #	$2227,5 \pm 95,7$	$7,4 \pm 0,3$
ПМ + ФР	$96192,0 \pm 8805,2$	$9,1 \pm 0,7$	$747,1 \pm 62,3$	$50,0 \pm 2,5$	$109262,3 \pm 11857,7$	$9,3 \pm 1,0$	$833,8 \pm 49,9$	$50,0 \pm 2,5$	$2354,7 \pm 124,4$	$7,8 \pm 0,4$

Примечание. * — по сравнению со значением показателя в группе «ПМ + дипротин А», $p < 0,05$ (по непарному непараметрическому критерию Манна—Уитни); + — по сравнению со значением показателя в группе «ПМ + дипротин А», $p < 0,09$; # — по сравнению со значением показателя в группе «ПМ + ФР», $p < 0,05$; x — по сравнению со значением показателя в группе «ПМ + ФР», $p < 0,08$; число животных в группах указано в примечании к табл. 1

Таблица 3

Показатели тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у крыс, подвергнутых действию дипротина А или ФР в период с 5-го по 18-й постнатальные дни и вскормленных крысами-самками, получавшими омега-3 ПНЖК или ПМ в период лактации. Возраст крыс — 2 мес.

Группа	ОР, время (мс)	ОР, посещения (число)	ОР, пробег (см)	ОР, предпочтение (%)	ЗР, время (мс)	ЗР, посещения (число)	ЗР, пробег (см)	ЗР, предпочтение (%)	Общий пробег (см)	Средняя скорость перемещения (см/с)
Омега-3 ПНЖК + дипротин А	$4424,1 \pm 1843,4$ *	$0,9 \pm 0,3$ *	$26,3 \pm 11,7$ *	$13,5 \pm 4,3$ +	$249983,9 \pm 12409,3$ +	$4,5 \pm 0,7$ *	$810,5 \pm 41,2$ *	$86,5 \pm 4,3$ +	$1104,3 \pm 72,9$ *	$3,7 \pm 0,2$ *
Омега-3 ПНЖК + ФР	$7544,8 \pm 2625,4$	$1,0 \pm 0,4$	$64,9 \pm 24,3$	$10,6 \pm 3,7$	$254882,2 \pm 12083,2$	$5,2 \pm 0,8$	$803,1 \pm 77,3$ #	$89,4 \pm 3,7$	$1164,5 \pm 141,3$ #	$3,9 \pm 0,5$ #
ПМ + дипротин А	$18366,9 \pm 4971,2$ x	$2,6 \pm 0,5$ #	$153,5 \pm 38,2$ x	$23,8 \pm 3,4$ #	$220711,1 \pm 13334,7$ x	$7,1 \pm 0,8$	$1061,5 \pm 72,6$	$76,2 \pm 3,4$ #	$1649,1 \pm 87,2$	$5,5 \pm 0,3$
ПМ + ФР	$7820,1 \pm 3671,2$	$1,1 \pm 0,5$	$77,7 \pm 38,4$	$10,0 \pm 3,7$	$249952,2 \pm 9728,0$	$6,9 \pm 1,1$	$1331,5 \pm 199,9$	$90,0 \pm 3,7$	$1749,5 \pm 187,0$	$5,8 \pm 0,6$

Примечание. * — по сравнению со значением показателя в группе «ПМ + дипротин А», $p < 0,05$ (по непарному непараметрическому критерию Манна—Уитни); + — по сравнению со значением показателя в группе «ПМ + дипротин А», $p < 0,09$; # — по сравнению со значением показателя в группе «ПМ + ФР», $p < 0,05$; x — по сравнению со значением показателя в группе «ПМ + ФР», $p < 0,08$; число животных в группах указано в примечании к табл. 1

пе «ПМ + ФР»; $p < 0,05$), то есть было нарушено поведение, связанное с оценками риска. Снижение числа свешиваний свидетельствовало о большей тревожности одномесячных крыс группы «ПМ + дипротин А» по сравнению с контролем, что согласуется с изменением основных показателей тревожности в ПКЛ в этом возрастном периоде (табл. 2). У животных с введением ФР в ПНД 5—18 действие омега-3 ПНЖК проявлялось статистически значимым снижением числа свешиваний ($9,7 \pm 1,6$, данные контрольной группы приведены выше) на фоне тен-

денции к уменьшению длительности свешиваний из ОР ($8208,1 \pm 2006,7$ мс в группе «Омега-3 ПНЖК + ФР» по сравнению с $12097,5 \pm 2157,3$ мс в группе «ПМ + ФР»; $p < 0,10$), что подтверждает наличие анксиогенных свойств у омега-3 ПНЖК в указанных условиях. Межгрупповых различий по показателям числа, длительности и латентного периода появления стоек и груминга не выявлено.

У взрослых крыс не было обнаружено изменений в поведении, связанном с оценками риска, что соответствовало отсутствию признаков повышения тревожности в этой возрастной группе. Однако в группе «Омега-3 ПНЖК + дипротин А» по сравнению с контрольной группой «ПМ + ФР» было выявлено увеличение числа эпизодов груминга ($5,9 \pm 0,7$ и $3,3 \pm 0,7$ соответственно; $p < 0,05$) и снижение латентного периода появления груминга ($72897,9 \pm 9429,0$ мс и $167323,3 \pm 25768,2$ мс соответственно; $p < 0,05$). Суммарная длительность груминга в группе «Омега-3 ПНЖК + дипротин А» была больше, чем в группе «Омега-3 ПНЖК + ФР» ($37910,2 \pm 7685,7$ мс и $12486,5 \pm 4443,0$ мс, $p < 0,05$; в контроле длительность груминга составила $22188,1 \pm 6900,1$ мс). Данные свидетельствовали об увеличении эмоциональной напряженности у крыс в группе «Омега-3 ПНЖК + дипротин А». Надо отметить, что ни в группе «Омега-3 + ФР», ни в группе «ПМ + дипротин А» таких нарушений не было выявлено, то есть каждый из факторов в отдельности — омега-3 ПНЖК либо дипротин А — не приводил к росту эмоциональной напряженности. Патогенное действие было обусловлено сочетанием двух факторов, один из которых — омега-3 ПНЖК — принято рассматривать как фактор позитивного действия.

*Депрессивноподобное поведение.
Тест принудительного плавания*

В группе крыс «ПМ + дипротин А» по сравнению с соответствующим контролем (группа «ПМ + ФР») в возрасте 1 мес. наблюдалось депрессивноподобное поведение: снижение длительности активного плавания, увеличение длительности иммобильности (так называемое «поведенческое отчаяние»), снижение числа периодов активного плавания в сочетании с увеличением кратких периодов иммобильности, что приводило к росту ИД (рис. 1). У детенышей, матери которых в период вскармливания получали омега-3 ПНЖК, неонатальное введение дипротина А не вызывало развития депрессивноподобного состояния; более того, у крыс в группе «Омега-3 ПНЖК + дипротин А» число периодов активного плавания было увеличено по сравнению с группой «Омега-3 ПНЖК + ФР». В группе «Омега-3 ПНЖК + дипротин А» по сравнению с группой «ПМ + дипро-

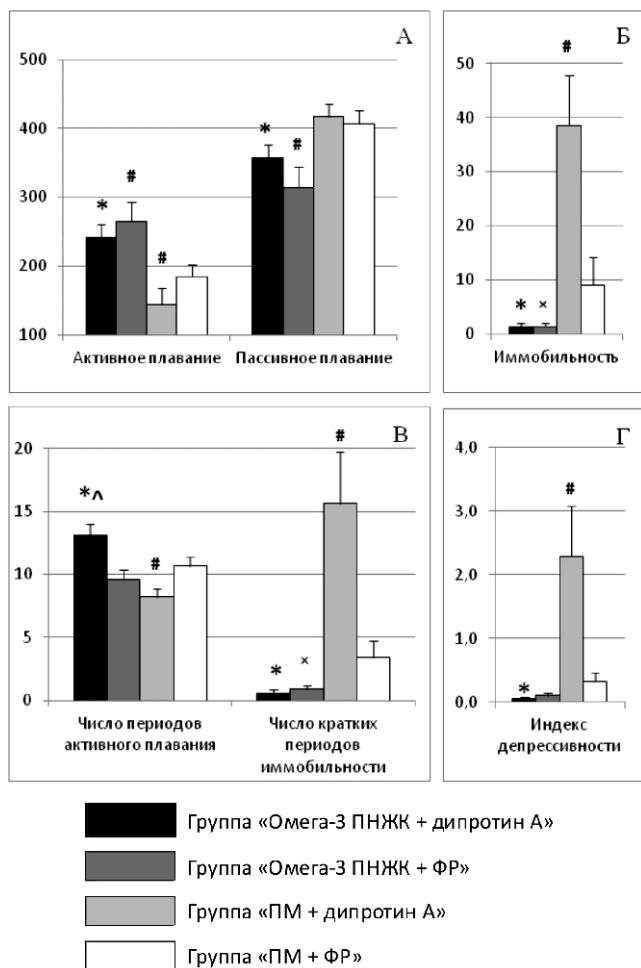


Рис. 1. Длительность (с) активного и пассивного (А) плавания, иммобильности (Б), биоритмологическая структура плавательного поведения (В) и индекс депрессивности (Г) в тесте принудительного плавания у крыс в возрасте 1 мес., подвергнутых действию дипротина А или ФР в период с 5-го по 18-й постнатальные дни и вскормленных крысами-самками, получавшими омега-3 ПНЖК или ПМ в период лактации. ПМ — подсолнечное масло, ФР — физиологический раствор; * — по сравнению со значением в группе «ПМ + дипротин А», $p < 0,05$; # — по сравнению со значением показателя в группе «ПМ + ФР», $p < 0,05$; x — по сравнению со значением показателя в группе «ПМ + ФР», $p < 0,08$; ^ — по сравнению со значением показателя в группе «Омега-3 ПНЖК + ФР», $p < 0,05$ (по непарному непараметрическому критерию Манна–Уитни).

тин А» длительность активного плавания была увеличена, пассивного — снижена, иммобильности — снижена, число периодов активного плавания — увеличено, число периодов иммобильности и ИД — снижены, то есть омега-3 ПНЖК проявляли свойства антидепрессантов. У крыс в группе «Омега-3 ПНЖК + ФР» по сравнению с группой «ПМ + ФР» длительность активного плавания была увеличена, а пассивного — снижена, отмечалось уменьшение длительности и числа кратких периодов иммобильности, а также величины ИД (на уровне тенденции), то есть омега-3 ПНЖК проявляли свойства психостимуляторов и способствовали формированию антидепрессивного фенотипа, что принципиально согласуется с данными зарубежных авторов об антидепрессантном действии омега-3 ПНЖК на взрослых крыс, не подвергавшихся предварительному депрессогенному действию [21].

В возрасте 2 мес. животные не демонстрировали депрессивноподобное поведение в тесте принудительного плавания. Сохранялось превышение числа периодов активного плавания у крыс в группе «Омега-3 ПНЖК + дипротин А» над величиной данного показателя в группе «ПМ + дипротин А» ($p = 0,002$), то есть, отмечался психостимулирующий эффект омега-3 ПНЖК в случае внешнего депрессогенного воздействия.

Зоосоциальное взаимодействие

У крыс подросткового возраста в группе «ПМ + дипротин А» были снижены число и длительность активных неагрессивных социальных контактов по сравнению с показателями в контрольной группе «ПМ + ФР» (рис. 2). Кроме того, неонатальное введение дипротина А детенышам, матери которых получали в период лактации ПМ, приводило к увеличению длительности агрессивных контактов. В целом, результаты исследования свидетельствовали о развитии повышенной агрессивности у крыс группы «ПМ + дипротин А», что подтверждало данные наших предыдущих исследований с неонатальным применением дипротина А при отсутствии ПМ в рационе кормящих самок [15]. В группах крысят, которым неонатально вводили дипротин А либо ФР и которые получали омега-3 ПНЖК с молоком матери, не выявлено различий по показателям активного неагрессивного и агрессивного взаимодействия, то есть омега-3 ПНЖК не предотвращали снижение неагрессивного социального взаимодействия и рост агрессивности. Более того, в группе «Омега-3 ПНЖК + ФР» активное неагрессивное взаимодействие было статистически значимо снижено, а длительность агрессивных контактов увеличена (на уровне выраженной тенденции) по сравнению с группой «ПМ + ФР». Таким

образом, омега-3 ПНЖК в условиях их приема в неонатальном периоде, подобно дипротину А, способствовали увеличению агрессивности, спровоцированной предварительной двух-трехдневной изоляцией крыс, что нашло отражение в отсутствии статистически значимых отличий по показателям агрессивности между животными в группах «Омега-3 ПНЖК + ФР» и «ПМ + дипротин А».

Привыкание и сенсомоторная реактивность по показателям акустического стартл-рефлекса у крыс

По результатам двухфакторного анализа не выявлено влияния фактора «Группа» на характер привыкания по показателю снижения $A_{отн}$ в динамике тестирования АСО: $F = 0,447$; $p = 0,720$ (рис. 3, А). Таким образом, ни в одной из экспериментальных групп не обнаружено нарушения кратковременного

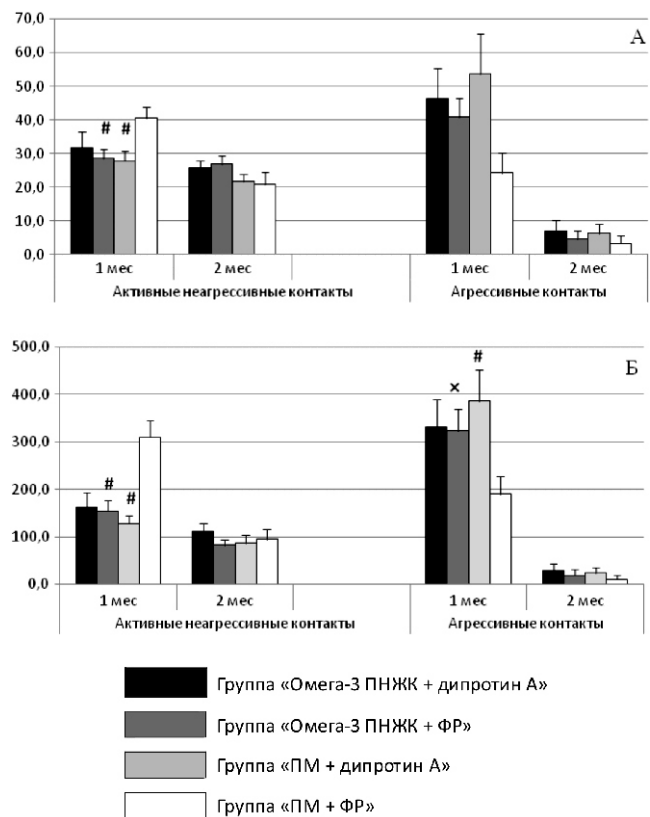


Рис. 2. Число (А) и длительность (Б) социальных контактов в тесте зоосоциального взаимодействия у крыс, подвергнутых действию дипротина А или ФР в период с 50-го по 18-й постнатальные дни и вскормленных крысами-самками, получавшими омега-3 ПНЖК или ПМ в период лактации. По вертикальной оси: А — число социальных контактов; Б — длительность социальных контактов, с. По горизонтальной оси — возраст крыс при обследовании. ПМ — подсолнечное масло, ФР — физиологический раствор; # — по сравнению со значением показателя в группе «ПМ + ФР», $p < 0,05$; x — по сравнению со значением показателя в группе «ПМ + ФР», $p < 0,07$ (непараметрический критерий Манна-Уитни).

привыкания по сравнению с контролем, то есть не выявлено нарушений неассоциативного обучения в акустическом стартл-рефлексе.

По результатам однофакторного анализа не выявлено отличий между опытными и контрольной группами ни по амплитуде АСО, ни по его ПСТ при разных интенсивностях модуляции основного сигнала (рис. 3, Б).

В наших предыдущих исследованиях показано, что развитие тревожно-депрессивного состояния, индуцированного действием синтетического ингибитора ДПП-IV метионил-2(S)-цианопирролидина в ПНД 5—18, ассоциируется с повышением активности ПЭП во фронтальной коре, гипоталамусе, прилежащем ядре мозга и стриатуме [22], а антидепрессант имипрамин и ингибитор ПЭП бензилоксикарбонил-метионил-2(S)-цианопирролидин со свойствами антидепрессанта, нормализуя поведение крыс на данной модели, снижают активность ПЭП в мозге до контрольного уровня [12]. По данным настоящего исследования, омега-3 ПНЖК проявляют свойства антидепрессанта на модели тревожно-депрессивного состояния, индуци-

рованного другим ингибитором ДПП-IV — дипротин А. Можно полагать, что антидепрессивный эффект омега-3 ПНЖК обусловлен их тормозным действием на активность ПЭП [10]. В пользу данного предположения свидетельствуют недавно полученные нами данные о том, что на указанной модели развитие эмоционально-мотивационных нарушений сопровождается повышением в стриатуме экспрессии гена, кодирующего ПЭП [23]. Однако повышение тревожности и агрессивности, по-видимому, обусловлено другими механизмами.

Заключение

Омега-3 ПНЖК, обладающие свойствами ингибиторов ПЭП, в условиях введения кормящим самкам, предотвращали развитие депрессивноподобного поведения в потомстве у крысят подросткового возраста, подвергнутых неонатальному действию ингибитора ДПП-IV дипротина А, и способствовали формированию антидепрессивного фенотипа у крысят контрольных групп. При этом Омега-3 ПНЖК оказывали угнетающее влияние на исследовательскую активность у потомства, подобно неонатальному действию дипротина А, и не предотвращали снижение исследовательской активности на модели экспериментального тревожно-депрессивного состояния. Омега-3 ПНЖК в условиях их введения кормящим крысам-самкам увеличивали тревожность у крысят подросткового возраста, получавших неонатально как дипротин А, так и ФР, а у крыс, достигших двухмесячного возраста, оказывали тормозящее действие на двигательную активность, снижая скорость перемещения. В случае неонатального введения дипротина А омега-3 ПНЖК способствовали повышению эмоциональной напряженности у взрослых крыс. Омега-3 ПНЖК не предотвращали увеличение агрессивности у одномесячных крысят, получавших неонатально дипротин А, а у крысят контрольной группы уменьшали неагрессивное социальное взаимодействие и несколько увеличивали агрессивность. Омега-3 ПНЖК не влияли на сенсомоторную реактивность и кратковременное привыкание у крыс, получавших дипротин А или ФР в ПНД 5—18.

Результаты работы развивают представления об участии пролинспецифических пептидаз ДПП-IV и ПЭП в генезе депрессивноподобного поведения, тревожности и агрессивности, а также расширяют представления о спектре влияний омега-3 ПНЖК на поведение потомства в условиях их неонатального применения с молоком матери, что определяет необходимость дальнейших исследований эффектов омега-3 ПНЖК на поведение потомства самок, получавших препарат в период лактации.

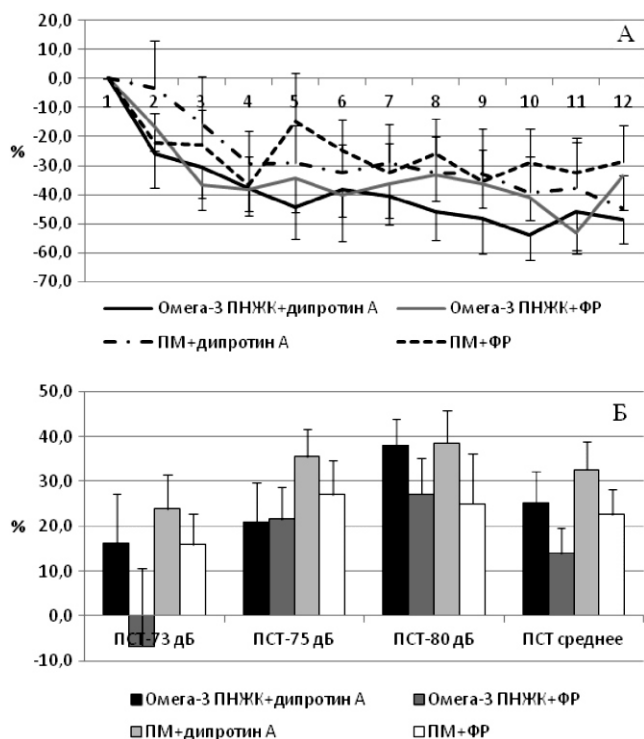


Рис. 3. Динамика привыкания (А) и предстимульное торможение (Б) акустического стартл-ответа у крыс, подвергнутых действию дипротина А или ФР в период с 5-го по 18-й постнатальные дни и вскормленных крысами-самками, получавшими омега-3 ПНЖК или ПМ в период лактации. По вертикальной оси: А — относительное снижение амплитуды АСО, %; Б — предстимульное торможение (ПСТ), %. По горизонтальной оси: А — номера блоков; Б — ПСТ при разной интенсивности модулирующего сигнала и усредненное значение ПСТ по трем интенсивностям предстимула.

References

- Adams M.S., Adams R.B., Wessman C.A., Demmig-Adams B. Nutritional Cues Tie Living Organisms to Their Environment and Its Sustainability. *Front. Nutr.* 2016; Aug 12;3:28. doi: 10.3389/fnut.2016.00028. eCollection 2016.
- Walz C.P., Barry A.R., Koshman S.L. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in the prevention of cardiovascular disease. *Can. Pharm. J. (Ott)*. 2016; May;149(3):166-73. doi: 10.1177/1715163516640812.
- Backes J., Anzalone D., Hilleman D., Catini J. The clinical relevance of omega-3 fatty acids in the management of hypertriglyceridemia. *Lipids Health Dis.* 2016; Jul 22;15(1):118. doi: 10.1186/s12944-016-0286-4.
- Sala-Vila A, Diaz-Lopez A, Valls-Pedret C., Cofan M., Garcia-Layana A., Lamuela-Raventos R.M., Castaner O., Zanon-Moreno V., Martinez-Gonzalez M.A., Toledo E., Bascora J., Salas-Salvado J., Corella D., Gomez-Gracia E., Fiol M., Estruch R., Lapetra J., Fito M., Aros F., Serra-Majem L., Pinto X., Ros E., Prevencion con Dieta Mediterranea (PREDIMED) Investigators. Dietary Marine ω -3 Fatty Acids and Incident Sight-Threatening Retinopathy in Middle-Aged and Older Individuals With Type 2 Diabetes: Prospective Investigation From the PREDIMED Trial. *JAMA Ophthalmol.* 2016; Aug 18. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2016.2906.
- Pusceddu M.M., Kelly P., Stanton C., Cryan J.F., Dinan T.G. N-3 Polyunsaturated Fatty Acids through the Lifespan: Implication for Psychopathology. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2016; Sep 21. pii: pyw078. doi: 10.1093/ijnp/pyw078.
- Carlson S.J., Fallon E.M., Kalish B.T., Gura K.M., Puder M. The role of the ω -3 fatty acid DHA in the human life cycle. *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.* 2013; 37(1):15-22. doi:10.1177/0148607112467821.
- Larrieu T., Hiral M.L., Fourrier C., De Smedt-Peyrusse V., Sans N., Capuron L., Laye S. Nutritional omega-3 modulates neuronal morphology in the prefrontal cortex along with depression-related behaviour through corticosterone secretion. *Transl. Psychiatry.* 2014; 4:e437. doi: 10.1038/tp.2014.77.
- Park Y.M., Lee B.H., Lee S.H. The association between serum lipid levels, suicide ideation, and central serotonergic activity in patients with major depressive disorder. *J. Affect. Disord.* 2014; 159: 62-6. doi: 10.1016/j.jad.2014.01.016.
- Appleton K.M., Grippo A.J., Beltz T.G., Johnson A.K. Consumption of a high n-3 polyunsaturated fatty acid diet during gradual mild physiological stress in rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2015; 95:11-8. doi: 10.1016/j.plefa.2014.11.010.
- Park Y.S., Jang H.J., Lee K.H., Hahn T.R., Paik Y.S. Prolyl endopeptidase inhibitory activity of unsaturated fatty acids. *J. Agric. Food. Chem.* 2006; 54(4): 1238-42.
- Khlebnikova N.N., Krupina N.A., Orlova I.N., Bogdanova N.G., Zolotov N.N., Kryzhanovskii G.N. Effect of a prolyl endopeptidase inhibitor benzyloxycarbonyl-alanyl-proline on the development of experimental depressive syndrome in rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009; 147(3): 291-5. DOI 10.1007/s10517-009-0494-2
- Khlebnikova N.N., Krupina N.A., Kushnareva E.Yu., Zolotov N.N., Kryzhanovskii G.N. Effect of imipramine and prolyl endopeptidase inhibitor benzyloxycarbonyl-methionyl-2(S)-cyanopyrrolidine on activity of proline-specific peptidases in the brain of rats with experimental anxious-depressive syndrome. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012; 152(4): 409-12. DOI: 10.1007/s10517-012-1540-z
- Krupina N.A., Bogdanova N.G., Khlebnikova N.N., Zolotov N.N., Kryzhanovskii G.N. Benzyloxycarbonyl-methionyl-2(S)-cyanopyrrolidine, a prolyl endopeptidase inhibitor, modulates depression-like behavior of rats in forced swimming test and activities of proline-specific peptidases in the brain structures. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013; 154(5): 606-9. DOI: 10.1007/s10517-013-2010-y
- Khlebnikova N.N., Krupina N.A., Bogdanova N.G., Orlova I.N., Zolotov N.N. Effect of prolyl endopeptidase inhibitor benzyloxycarbonyl-methionyl-2(S)-cyanopyrrolidine on the course of experimental depressive syndrome in rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013; 155(2): 190-3. DOI 10.1007/s10517-013-2109-1
- Krupina N.A., Khlebnikova N.N. Neonatal exposure to the dipeptidyl peptidase-IV inhibitors diprotin A and sitagliptin induces depression-like behavior, anxiety, and latent aggression in adolescent and adult rats. *J. Behav. Brain Sci.* 2016; 6(4): 167-83. <http://dx.doi.org/10.4236/jbbs.2016.64018>
- Gus'kova T.A. Preclinical toxicological study of drugs as a guarantee of their safe clinical investigations. *Toksikol. Vestnik.* 2010; 5: 2-5. (in Russian)
- Kanji S., Seely D., Yazdi F., Tetzlaff J., Singh K., Tsertsvadze A., Tricco A.C., Sears M.E., Ooi T.C., Turek M.A., Skidmore B., Ansari M.T. Interactions of commonly used dietary supplements with cardiovascular drugs: a systematic review. *Syst. Rev.* 2012; 1:26. doi: 10.1186/2046-4053-1-26.
- O'Leary, T.P., Gunn, R.K. and Brown, R.E. What are we measuring when we test strain differences in anxiety in mice? *Behav. Genetics.* 2013; 43: 34-50.
- Krupina N.A., Khlebnikova N.N., Orlova I.N. Early social isolation increases aggression and impairs a short-term habituation in acoustic startle reflex in rats. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 2015; 59(4): 4-15. (in Russian)
- Valsamis B., Schmid S. Habituation and prepulse inhibition of acoustic startle in rodents. *J. Vis. Exp.* 2011; (55): e3446. doi: 10.3791/3446.
- Huang Shih-Yi, Yang Hui-Ting, Chiu Chih-Chiang, Pariante Carmine M., Su Kuan-Pin. Omega-3 fatty acids on the forced-swimming test. *J. Psychiatr. Res.* 2008; 42: 58-63.
- Kushnareva E.Yu., Krupina N.A., Khlebnikova N.N., Zolotov N.N., Kryzhanovskii G.N. Activities of proline-specific peptidases in brain structures of rats with experimental anxiety-depressive state caused by administration of dipeptidyl peptidase IV inhibitor in the early postnatal period. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011; 151(6): 675-9, DOI: 10.1007/s10517-011-1413-x
- Krupina N.A., Zubkov E.A., Orshanskaya E.V., Zorkina Y.A., Khlebnikova N.N. Gene expression in the brain of adult rats with behavioral alterations caused by neonatal exposure to the dipeptidyl peptidase-IV inhibitors diprotin A and sitagliptin. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2016; 26 (Suppl. 2): S173 DOI: 10.1016/S0924-977X(16)31000-8.

Сведения об авторах:

Хлебникова Надежда Николаевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы; e-mail: nanikh@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616:[615.214.31+615.213]

Кузнецова Л.В.¹, Карпова М.Н.¹, Зиньковский К.А.², Клишина Н.В.¹

Противосудорожные эффекты цитиколина и диазепама при их сочетанном применении на модели острых генерализованных судорог, вызванных пентилентетразолом, у крыс линии Вистар

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

² — ГБОУ ВПО «Тверской ГМУ» Минздрава России, 170100, г.Тверь, ул. Советская, д. 4

Цель исследования — изучение эффективности сочетанного применения цитиколина, обладающего ноотропным и противосудорожным действием, и антиэпилептического препарата диазепама на развитие острых генерализованных судорог (ОГС), вызванных конвульсантом пентилентетразолом (ПТЗ). **Методика.** Эксперименты выполнены на крысах самцах Вистар ($n = 68$) массой 160—190 г. Судороги вызывали внутрибрюшинным введением ПТЗ в дозе 80 мг/кг (модель ОГС). Для изучения эффективности сочетанного применения препаратов определяли минимальное противосудорожное действие каждого препарата в отдельности. Цитиколин (Цераксон, «Nicomed Ferrer Internacional, S.A.») вводили внутрибрюшинно в дозах 500 и 300 мг/кг за 1 ч до ПТЗ, диазепам (Реланиум, Варшавский фармацевтический завод Польфа АО, Варшава, Польша) — в дозах 0,5 и 0,25 мг/кг за 30 мин до введения ПТЗ. Контролем служили животные, которым вводили физиологический раствор том же объеме и в аналогичных условиях опыта. **Результаты.** Показано, что сочетанное внутрибрюшинное введение цитиколина и диазепама в минимально действующих дозах (300 и 0,25 мг/кг соответственно), усиливает противосудорожные свойства обоих препаратов. **Заключение.** Сочетанное применение цитиколина с диазепамом в минимально действующих дозах усиливает противосудорожные свойства обоих препаратов, снижая риск развития побочных эффектов. Исследование может служить экспериментальным обоснованием применения препаратов при судорогах с целью благоприятного влияния на когнитивные функции и замедления прогрессирования нейродегенеративных процессов.

Ключевые слова: эпилепсия; судороги; цитиколин; диазепам; ноотропные и антиэпилептические препараты.

Для цитирования: Кузнецова Л.В., Карпова М.Н., Зиньковский К.А., Клишина Н.В. Противосудорожные эффекты цитиколина и диазепама при их сочетанном применении на модели острых генерализованных судорог, вызванных пентилентетразолом у крыс Вистар. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 20—23.

Для корреспонденции: Карпова Маргарита Николаевна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли, e-mail: karpovamn@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 07.09.2016

Kuznetsova L.V.¹, Karpova M.N.¹, Zinkovski K.A.², Klishina N.Yu.¹

Anticonvulsant effects of citicoline and diazepam at their combined application on model of the acute generalized convulsions induced by pentylenetetrazole in Wistar rats

¹ — FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

² — GMU Russian Ministry of Health, 170100 Tver, Sovetskaya St., 4

The purpose. Studying of efficiency of the combined application of the citicoline possessing nootropic and anticonvulsive action and antiepileptic drug of diazepam on the acute generalized convulsions (AGC) caused by a convulsant pentylenetetrazole (PTZ). **Methods.** Experiments are executed on the male Wistar rats ($n = 68$) weighing 160—190 g on the AGC model caused by of PTZ in a dose of 80 mg/kg, intraperitoneally (i.p.). For studying of efficiency of the combined use of drugs determined the minimum anticonvulsive action of a citicoline (Tserakson, «Nicomed Ferrer Internacional, S.A.») and diazepam (Relanium, Warsaw pharmaceutical plant of Polf AO, Warsaw, Poland). For this citicoline were administered i.p. in doses 500 and 300 mg/kg 1 hour before the PTZ and diazepam — in doses of 0,5 and 0,25 mg/kg 30 min before administration of PTZ. Control animals were injected with saline to the same extent and under the same experimental conditions. **Results.** It

is shown that the combined administration of a citicoline and diazepam in minimum active doses (300 and 0.25 mg/kg respectively), increases anticonvulsive properties of both drugs. **Conclusion.** The combined administration of citicoline with diazepam in minimally active doses enhances anticonvulsant properties of both drugs, thereby reducing the risk of development of side effects. In addition, the research may serve as experimental justification for the use of drugs in case of convulsions for the purpose beneficial effect on cognitive function and delays of progressing of neurodegenerative processes.

Keywords: epilepsy; seizures; citicoline; diazepam; nootropics and antiepileptic drugs.

For citation: Kuznetsova L.V., Karpova M.N., Zinkovski K.A., Klishina N.Yu. Anticonvulsant effects of citicoline and diazepam at their combined application on model acute generalized convulsions induced by pentylentetrazole in Wistar rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2016; 60 (4): 20–23. (in Russ).

For correspondence: Karpova M.N., Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher, Laboratory of fundamental and applied problems of pain, e-mail: karpovamn@gmail.com

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Kuznetsova L.V., <http://orcid.org/0000-0002-0691-3690>

Karpova M.N., <http://orcid.org/0000-0002-4338-5567>

Zinkovski K.A., <http://orcid.org/0000-0002-6366-6622>

Klishina N.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-1348-1857>

Received 07.09.2016

Введение

Эпилепсия — сложное по этиологии и патогенезу хроническое заболевание головного мозга человека, характеризующееся повторными припадками, которые возникают в результате чрезмерных нейронных разрядов и сопровождаются разнообразными клиническими и параклиническими симптомами. Современные нейробиологические представления о патогенезе эпилепсии диктуют изменение подходов к ее лечению. Известно, что используемые для купирования повышенной судорожной активности мозга высокоэффективные классические и новые противоэпилептические лекарственные средства вызывают ряд побочных эффектов, к числу которых можно отнести нарушение основных когнитивных функций — внимания, памяти, восприятия и др. [1, 2]. Одним из основных направлений терапии указанных нарушений является применение ноотропов, оказывающих активизирующее влияние на интегративные механизмы мозга, которые имеют множественные точки приложения. При этом в патогенетические механизмы вовлекается большое количество анатомо-функциональных систем — нейротрансмиттерные, сосудистые, метаболизм клетки, реологические и т.д. Поэтому в последние годы нарастает исследовательская деятельность, связанная с поиском и изучением механизма действия новых и уже имеющихся ноотропных лекарственных средств, обладающих поликомпонентным спектром фармакологических эффектов и многофакторным механизмом действия [3–6]. Для лечения когнитивных расстройств сосудистого, травматического и интоксикационного генеза чаще всего применяют пирацетам. Однако его применение при эпилепсии ограничено

в связи с вызываемым им повышением судорожной активности мозга [7]. В настоящее время известна способность только двух ноотропов — мексидола и ноопепта — усиливать противосудорожное действие некоторых противоэпилептических препаратов [5, 8]. Ноотроп цитиколин (аналог эндогенного цитиколина) обладающий нейрорегенеративными и нейропротективными свойствами [9–13], широко применяется в лечении когнитивных, чувствительных, двигательных неврологических нарушений дегенеративной и сосудистой этиологии. Ранее нами было показано на модели острых генерализованных судорог (ОГС), что цитиколин оказывает противосудорожное действие и его сочетанное введение с вальпроатом в минимально действующих дозах усиливает противосудорожный эффект обоих препаратов [3, 4, 6].

Цель исследования — изучение сочетанного применения цитиколина, обладающего ноотропным и противосудорожным действием, и антиэпилептического препарата диазепама на ОГС, вызванные конвульсантом пентилентетразолом (ПТЭ).

Методика

Эксперименты выполнены на крысах самцах Вистар ($n = 68$) массой 160–190 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003 г.

Эффективность сочетанного применения цитиколина и диазепама изучали на модели ОГС, вызванных внутрибрюшинным введением ПТЗ в дозе 80 мг/кг. Определяли латентные периоды первых судорожных проявлений, клонической и тонической фаз (падение животного на бок) генерализованной судорожной реакции, длительность этих фаз, тяжесть судорожной реакции, продолжительность жизни и летальность. Тяжесть судорожной реакции оценивали в баллах:

- 1 — миоклонические вздрагивания;
- 2 — клонические судороги передних конечностей (поза «кенгуру»);
- 3 — повторные клонические судороги;
- 4 — тонико-клонические судороги с падением животного на бок;
- 5 — повторные тонико-клонические судороги и/или гибель животного.

Для изучения эффективности сочетанного применения цитиколина и диазепама на ОГС у животных определяли минимальное противосудорожное действие каждого препарата. Цитиколин (Цераксон, «Nicomed Ferrer Internacional, S.A.») вводили внутрибрюшинно в дозах 500 и 300 мг/кг за 1 ч до ПТЗ, а диазепам (Реланиум, Варшавский фармацевтический завод Польфа АО, Варшава, Польша) — в дозах 0,5 и 0,25 мг/кг за 30 мин до введения ПТЗ. Контролем служили животные, которым вводили физиологический раствор том же объеме и в аналогичных условиях опыта.

Статистическую обработку данных осуществляли по алгоритмам программы «IBM SPSS Statistic 20». Проводили предварительную проверку предположения о нормальном характере распределения эмпирических данных в каждой экспериментальной группе по тестам Колмогорова—Смирнова. Оценку значимости показателей и различий рассматриваемых выборок проводили по t-критерию Стьюдента. Частоту встречаемости признака оценивали с помощью точного метода Фишера. Для всех количественных признаков в сравниваемых группах производилась оценка среднеарифметических и среднеквадратических (стандартных) ошибок среднего. Числовые данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. Статистически значимыми считали различия между группами при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

У контрольных животных введение ПТЗ приводило к развитию генерализованной эпилептической активности: через 50—55 с появлялись первые судорожные проявления в виде вздрагивания головы или отдельных мышц туловища, которые переходили в клонические вздрагивания всего тела. Через 57—63 с следовали клонические судороги передних конечностей с подъемом животного на задние лапы (поза «кенгуру»). Завершались судороги тонико-клоническим припадком с падением животного на бок и фазой постприступной депрессии. Тяжесть судорог у животных в среднем составляла 4,43 балла, а летальность — 78,57% (таблица).

Таблица

Влияние сочетанного применения цитиколина и диазепама на острые генерализованные судороги (M ± m)

Группа и число (n) животных	ЛП первых судорожных проявлений, с	Клонические судороги		Тонические судороги		Тяжесть судорог, балл	Продолжительность жизни животных, с	Летальность, %
		ЛП, с	Длительность, с	ЛП, с	Длительность, с			
Контроль, n = 14	53,79 ± 2,21	60,79 ± 3,43	13,55 ± 1,28	86,78 ± 10,33	16,45 ± 0,99	4,43 ± 0,31	708,09 ± 120,80	78,57
Цитиколин, 500 мг/кг, n = 12	67,58 ± 3,61 ***XXOOOO	85,00 ± 5,17 ****XXXOOOOO	13,42 ± 1,26	438,00 ****X	17,00 O	2,42 ± 0,26 ****OOO	1212 XXXX	8,33 ****OOO
Цитиколин, 300 мг/кг, n = 10	51,90 ± 1,84	62,60 ± 2,13	14,50 ± 2,01	181,60 ± 44,37 *	14,80 ± 1,83	3,80 ± 0,42	587,20 ± 182,17	50,00
Диазепам, 0,50 мг/кг, n = 10	66,20 ± 1,93 ***XXOOOOO	77,70 ± 2,45 ****XXXOOOOO	11,10 ± 0,43	424,00 ****X	12,00	2,20 ± 0,20 ****	—	—
Диазепам, 0,25 мг/кг, n = 10	49,20 ± 4,18	55,00 ± 5,48	14,20 ± 2,02	96,33 ± 15,06	10,33 ± 0,33	2,9 ± 0,46 **oooo	255,67 ± 15,67	30,00 **
Диазепам, 0,25 мг/кг + цитиколин, 300 мг/кг, n = 12	67,33 ± 3,71 **XXOOOO	84,50 ± 6,07 **** XXXOOO	13,00 ± 0,99	380,00 ± 145,16 ***	14,00 ± 1,15	2,67 ± 0,36 ****O	450,00 ± 160,00	16,67 ****OO

Примечание: ЛП — латентный период; * — $p < 0,03$; ** — $p < 0,003$; *** — $p < 0,01$; **** — $p < 0,001$ — по сравнению с контролем; X — $p < 0,01$; XX — $p < 0,004$; XXX — $p < 0,002$; XXXX — $p < 0,001$ — по сравнению с диазепамом 0,25 мг/кг; O — $p < 0,05$; OO — $p < 0,04$; OOO — $p < 0,01$; OOOO — $p < 0,003$; OOOOO — $p < 0,001$ — по сравнению с цитиколином 300 мг/кг

1. Эффекты цитиколина

Введение цитиколина в дозе 500 мг/кг оказывало противосудорожное действие, которое выражалось в увеличении на 25,64% латентного периода первых судорожных проявлений и развития клонических судорог на 39,82% по сравнению с группой контрольных животных (таблица). Тонико-клонический припадок с падением животного на бок и фазой постприступной депрессии наблюдали только у одного животного, латентный период его наступления увеличился в 5 раз. Тяжесть судорог была ниже на 45,37%, чем в контрольной группе. Введение цитиколина в дозе 300 мг/кг вызывало у животных только удлинение латентного периода наступления тонических судорог по сравнению с группой контрольных животных.

2. Эффекты диазепама

Противосудорожное действие диазепама в дозе 0,5 мг/кг выражалось в увеличении латентных периодов первых судорожных проявлений и клонических судорог на 23,07% и 27,82% соответственно, снижении на 49,66% тяжести судорог и предотвращения гибели животных по сравнению с контрольными (таблица). Следует отметить, что тонические судороги наблюдали только у одного животного и латентный период их появления значительно возрастал по сравнению с контролем и был сопоставим с группой животных с введением цитиколина в дозе 500 мг/кг. Введение диазепама в дозе 0,25 мг/кг вызывало только снижение тяжести судорог и летальности и не влияло на другие показатели судорожной активности по сравнению с контролем.

Таким образом, цитиколин и диазепам в дозах 300 и 0,25 мг/кг оказывали наименее выраженное противосудорожное действие и были использованы для проведения дальнейшего исследования.

3. Эффекты сочетанного применения цитиколина и диазепама

Сочетанное применение цитиколина в дозе 300 мг/кг и диазепама в дозе 0,25 мг/кг привело к усилению противосудорожных свойств обоих препаратов (таблица). Так, латентные периоды появления первых судорожных проявлений и клонических судорог, а также тяжесть судорог и летальность были сравнимы с животными, получавшими эти препараты в больших дозах, 500 и 0,50 мг/кг соответственно.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что сочетанное применение цитиколина с диазепамом

в минимально действующих дозах усиливает противосудорожные свойства обоих препаратов. Важно отметить, что применение препаратов в низких дозах снижает риск развития побочных эффектов. Исследование может служить экспериментальным обоснованием применения цитиколина с целью благоприятного влияния на когнитивные функции и замедления прогрессирования нейродегенеративных процессов.

References

1. Fritz N., Glogau S., Hoffmann J. et al. Efficacy and cognitive side effects of tiagabine and topiramate in patients with epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2005; 6 (3): 373-81.
2. Meador K.J., Loring D.W., Moore E.E. et al. Comparative cognitive effects of phenobarbital, phenytoin, and valproate in healthy adults. *Neurology.* 1995; 45(8): 1494-9.
3. Karpova M.N., Kuznecova L.V., Zin'kovskij K.A., Klishina N.Ju. Increasing the threshold of convulsive reactions after administration of citicoline mice C57Bl/6. *Bul. eksper. biol. i med.* 2014; 158 (9): 296-8. (in Russian).
4. Karpova M.N., Zin'kovskij K.A., Kuznecova L.V., Klishina N.Ju. Anticonvulsant effects of citicoline and valproate during their combined application on the model of acute generalized seizures caused by pentylenetetrazole in Wistar rats. *Bul. eksper. biol. i med.* 2015; 160(10): 425-8. (in Russian).
5. Kravchenko E.V., Ponteleva I.V., Trofimov S.S. et al. The original nootropic and neuroprotective drug noopept potentiates the anticonvulsant activity of valproate in mice. *Eksp. i klin. farmakol.* 2009; 72(6): 15-7. (in Russian)
6. Kuznecova L.V., Karpova M.N., Zin'kovskij K.A., Klishina N.Ju. Effect of citicoline on the development of chronic epileptization of brain (pentylenetetrazole kindling) and acute generalized seizures in mice C57Bl/6 subjected to kindling. *Patol. fiziol. i eksperim. terapiya.* 2014; 58(3): 4-8. (in Russian)
7. Lender P. Pharmacotherapy of epilepsy: safety problems. *Epilepsia. Modern Aspects of Treatment.* Chicago: Illinois Univ. Ed., 2010; P. 184-99.
8. Voronina T.A. Meksidol: spectrum of pharmacological effects. *Zh nevol. i psikh.im. S.S. Korsakova.* 2012; 112(12): 86-90. (in Russian)
9. Alvarez-Sabin J., Roman G.C. The Role of Citicoline in Neuroprotection and Neurorepair in Ischemic Stroke. *Brain Sci.* 2013; 3(3): 1395-414.
10. Hurtado O., Moro M.A., Cardenas A. et al. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol. Dis.* 2005; 18 (2): 336-45.
11. Hurtado O., Lizasoain I., Moro M.A. Neuroprotection and recovery: recent data at the bench on citicoline. *Stroke.* 2011; 42(Suppl. 1): 33-5.
12. Saver J.L. Citicoline: update on a promising and widely available agent for neuroprotection and neurorepair. *Rev. Neurol. Dis.* 2008; 5(4): 167-77.
13. Secades J.J. Probably role of citicoline in stroke rehabilitation: review of literature. *Rev. Neurol.* 2012; 54(3): 173-9.

Сведения об авторах:

Кузнецова Лада Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП

Зиньковский Константин Александрович, канд. мед. наук, доцент каф. психиатрии, наркологии и медицинской психологии ГБОУ ВПО Тверской ГМУ Минздрава России

Клишина Наталья Юрьевна, науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616.69-008.6

Никитина И.Л., Ходулева Ю.Н., Масель А.С., Байрамов А.А., Шабанов П.Д.

Система KISS-KISS1R: периферический сигналинг в андрогензависимых тканях в модели мужского гипогонадизма

ФГБУ «Северо-Западный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, 197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акkuratова, д. 2

Система кисспептина, включающая в себя ген KISS-1, кисспептины и G-протеин связывающий рецептор 54 (GPR54), в последние годы рассматривается как ключевое звено активации гонадотропной оси. Эффекты кисспептинов на гонады и периферические ткани мало изучены. **Цель.** Изучить влияние экспериментального гипогонадизма самцов крыс на кисспептиновый сигналинг в андрогензависимых периферических тканях и крови. **Методы.** Экспериментальная модель создана на самцах крыс линии Wistar (31 крыса). Созданы группы контроля — препубертатные крысы 2 мес. и пубертатные крысы 4 мес. Экспериментальная группа — крысы после односторонней гонадэктомии (ОГЭ) в неонатальном периоде и после ОГЭ в неонатальном периоде, получавшие терапию тестостерона пропионатом (5 мг/кг/сут. 10 сут.). Измерялась плотность GPR54 в яичках и мышцах, сывороточное содержание кисспептина и тестостерона. Статистические методы — непараметрический анализ (Me) с использованием W-критерия Вилкоксона. **Результаты.** Плотность GPR54 в гонадах группы ОГЭ ниже, чем в контрольной группе пубертатных крыс (Me 0,88 нг/мг и 1,13 нг/мг, $p < 0,05$) и сходна с группой контроля препубертатных крыс (Me 0,92 нг/мг). Плотность GPR54 в гонадах группы контроля половозрелых особей была значительно выше плотности в мышцах этой же группы (Me 0,784 нг/мг и 0,114 нг/мг соответственно, $p < 0,01$). В группе ОГЭ уровень тестостерона существенно ниже (Me 15,39 нг/мг) контрольной группы пубертатных крыс (Me 20,02 нг/мг, $p < 0,01$). Концентрация кисспептинов в обеих группах не имела значительных различий (0,27 нг/мг и 0,26 нг/мг, $p > 0,05$). Лечение тестостероном особей с ОГЭ увеличило уровень тестостерона (от 15,39 нг/мг до 26,26 нг/мг, $p < 0,01$), не влияя на плотность GPR54 в гонадах (Me 0,79 нг/мг). **Заключение.** Гипогонадизм ведет к снижению плотности GPR54 в периферических андрогензависимых тканях. Уровень кисспептинов плазмы крови физиологически низок и, вероятно, не может быть использован как маркер активности кисспептиновой системы. Лечение тестостероном значимо не изменяет плотность кисспептиновых рецепторов, что требует поиска новых терапевтических возможностей.

Ключевые слова: репродуктивная система; гипогонадизм; кисспептины; KISS1R; тестостерон.

Для цитирования: Никитина И.Л., Ходулева Ю.Н., Масель А.С., Байрамов А.А., Шабанов П.Д. Система KISS-KISS1R: периферический сигналинг в андрогензависимых тканях в модели мужского гипогонадизма. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 24–33.

Для корреспонденции: Никитина Ирина Леоровна, e-mail: nikitina0901@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.05.16

Nikitina I.L., Khoduleva Yu.N., Masel A.S., Bairamov A.A., Shabanov P.D.

System of KISS-KISS1R: focus on peripheral signaling in androgen-dependent tissues in the experimentally induced model hypogonadotropic hypogonadism

«North-West Federal Medical Research Center named after Almazov»; 2, ul. Akkuratova, St. Petersburg, 197341, Russia

Kisspeptins, ligands of G protein-coupled receptor 54 (GPR54) encoded by the KISS-1 gene, have recently emerged as key gatekeepers of the gonadotrophic axis. Unlike its role at the hypothalamus on GnRH secretion, the effects of kisspeptins on gonadal and other peripheral tissues need to be clarified. **The purpose.** To investigate the impact of experimentally induced hypogonadism in male rats on kisspeptins signaling in androgen-dependent tissues and blood. **Methods.** Wistar male rats (total number 31) were used. Rats were divided into four groups. Group 1 (control, prepubertal rats aged 2 months, $n = 7$). Group 2 (control, pubertal rats aged 4 months, $n = 6$). Group 3 (unilaterally gonadectomized (ULG) in neonatal period). Group 4 (ULG testosterone-treated with testosterone (T) propionate 5 mg/kg/d during 10 days). In all the four groups density of GPR54 in testes and muscle and serum kisspeptin levels and T levels were estimated. The data was expressed as median values (Me) that were compared by Wilkoxson criterion. **Results.** Density of GPR54 in gonads in group 3 was lower than in group 2 (Me 0,88 ng/mg vs 1,13 ng/mg, $p < 0,05$) and similar to group 1 (Me 0,92 ng/mg). Unlike above, density of

GPR54 in muscle in all groups 1,2,3 was not any differences (Me 0,1; 0,12; 0,13 ng/mg, $p>0,05$). Generally, density of GPR54 in group 2 in gonads was significantly higher than in the same group in muscle (Me 0,784 ng/mg vs 0.114 ng/mg, $p<0,01$). In the group 3 a significant decrease in serum levels of T (Me 15,39 ng/mg) in comparison with group 2 (Me 20,02 ng/mg, $p<0,01$) was invented. However, serum levels of kisspeptins in both groups had not any differences (0,27 ng/mg and 0,26 ng/mg, $p>0,05$). Treatment with testosterone propionate of the rats of group 4 lead to increase of serum level of T (from 15,39 ng/mg to 26,26 ng/mg, $p<0,01$), but didn't modify the density of GPR54 in gonads (Me 0,79 ng/mg). **Conclusions.** Hypogonadism lead to decrease of kisspeptins signaling in peripheral androgen-dependent tissues. Serum level of kisspeptins is physiologically low and, probably, it can not be used as a marker of activity of kisspeptins system. Efficacy of treatment with testosterone is not enough that is required a novel therapeutic resources.

Keywords: reproductive system; kisspeptin; KISS1R; hypogonadism; testosterone.

For citation: Nikitina I.L., Khoduleva Yu. N., Masel A., Bairamov A.A., Shabanov P.D. System of KISS-KISS1R: Focus on Peripheral Signaling in Androgen-dependent Tissues in the Experimentally Induced Model Hypogonadotropic Hypogonadism. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (4): 24–33. (in Russ).

For correspondence: Nikitina I. L. Professor, M.D., Ph.D., Chief of Pediatric Endocrinology Department «North-West Federal Medical Research Center named after Almazov»; 2, ul. Akkuratova, St. Petersburg, 197341, Russia, e-mail: nikitina0901@gmail.com

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 25.05.16

Введение

Функциональная активность репродуктивной системы играет важную роль в анатомической и психологической дифференцировке пола, старте и прогрессировании полового развития, возможности деторождения. Изучение закономерностей полового развития подростков, механизмов физиологической и патологической задержки реактивации гонадной оси, остается предметом активного исследовательского интереса [1, 2]. Понимание механизмов межнейронного сигналинга способно расширить представления о физиологии и патологии полового развития, понять причины различий в сроках старта пубертата, и, возможно, предложить новые способы коррекции отдельных вариантов патологии [3, 4, 5]. При этом совокупность процессов, предшествующих увеличению импульсной секреции гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ) нейронами гипоталамуса, инициации и закономерностей полового развития и вариабельности чувствительности центральных отделов гонадостата подростков до настоящего времени изучены недостаточно и являются предметом активного исследовательского интереса [6, 7].

Результаты многочисленных исследований показали, что запуск полового развития является мультифакторным процессом. Среди изучаемых в последние годы факторов особое значение принадлежит системе kisspeptina и некоторым другим мессенджерам центральной нервной системы (ЦНС) [1, 5]. К числу важных научных открытий последних лет относится установление роли лиганд-рецепторной системы kisspeptina в регуляции гипоталамо-гипофизарно-го-

надной оси [8, 9]. Данная система kisspeptina включает ген KISS1, локализованный на 1q32, продукты его транскрипционной активности — kisspeptины, реализующие свои эффекты через G-протеиновый парный рецептор GPR54 (KISS1R). Впервые идентифицированные в 1996 году группой исследователей-онкологов университета Пенсильвании, kisspeptины до 2003 года рассматривались, как супрессоры опухолевого роста при разных типах рака; наиболее важный из группы kisspeptинов известен, как метастин [10]. В 2003 г. в эксперименте были установлены новые свойства kisspeptина и его рецептора, как регулятора активации/реактивации гонадной оси и сексуальной дифференцировки головного мозга [11]. Согласно результатам большинства исследований, kisspeptины реализуют свои эффекты во взаимодействии с другими центральными и периферическими биологически активными субстанциями (нейропептидами, гормонами) [12—14]. Так, было показано, что нейрокинин-В коэкспрессируется с kisspeptином и динорфином [15—17]. Данное «трио» в настоящее время рассматривается как наиболее значимый участник реализации сигналинга, направленного на процессы активации/реактивации гонадной оси. Получены данные, что мутации с потерей функции в генах, кодирующих нейрокинин В (TAC3) и его рецептор (TAC3R) приводили к пубертатным нарушениям [16]. Согласно мнению большинства исследователей, предполагается, что kisspeptин стимулирует секрецию ГнРГ прямым влиянием на ГнРГ-содержащие нейроны, большинство из которых экспрессируют рецептор Kiss1R. Представляются интересными данные о различной анатомической локализации нейронов,

экспрессирующих KISS1 mRNA (нейроны перивентрикулярных (AVPV) ядер гипоталамуса участвуют в положительной обратной связи регуляции ГнРГ/гонадотропины половыми стероидами, а KISS1-нейроны аркуатных (ARC) ядер показали негативную обратную связь) [18].

В других исследованиях было показано, что киспептины могут выполнять роль транмиттеров в передаче сигналов от половых стероидов, а также осуществлять посреднические функции между лептином и ГнРГ-секретирующими центрами гипоталамуса [19—21].

Представляют интерес исследования, уточняющие роль периферических систем в осуществлении киспептинового сигналинга, направленного на поддержание функциональной активности гонадной оси [8]. Так, лютеинизирующий гормон (ЛГ) и фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), оказывая воздействие на половые железы, приводят к увеличению гонадных гормонов, и последующему развитию физиологических и поведенческих изменений в период половой зрелости. Половые стероиды оказывают центральное активирующее и организующее геномное воздействие на гипоталамические секс-диморфные центры. Продукты экспрессии генов в этих гипоталамических центрах инициируют поведение по мужскому или женскому типу [7, 8]. Многие исследования показали очень высокую степень колокализации KISS1- и KND-нейронов с рецепторами стероидных гонадных гормонов [1, 16].

Тем не менее, следует подчеркнуть, что уточнение большинства механизмов, опосредуемых киспептинами во влиянии на различные регуляторные процессы репродуктивной системы продолжает оставаться предметом активного исследовательского поиска [22]. Это представляется тем более важным в связи с увеличением количества фактических данных о перспективе применения агонистов и антагонистов киспептина для совершенствования технологий лечения разнообразных расстройств полового развития и репродукции [23—26].

Цель исследования — изучение некоторых нейроэндокринных механизмов регуляторного сигналинга с участием системы KISS-KISS1R в периферических андрогензависимых тканях в экспериментальной модели мужского гипогонадизма.

Методика

Экспериментальный материал: в исследование были включены новорожденные самцы крыс линии Wistar в возрасте 2—3 сут., массой 6—7 г (52 особи).

В настоящем исследовании у самцов крыс линии Wistar создавали модель экспериментально индуцированного гипогонадотропного гипогонадизма двумя способами:

1. Хирургическая модель — хирургическое удаление одной гонады у новорожденных крысят в возрасте 5 сут. постнатальной жизни (по стандарту экспериментальных физиологических исследований) [27, 28];

2. Комбинированная модель (хирургическая + медикаментозная) — введение Трипторелина-депо 0,29 мг/100 г в возрасте 4 мес. части крыс из группы хирургической модели с целью десентизации гонадотрофов [29].

Были сформированы следующие группы животных:

- 1-я группа — хирургическая модель 2 мес. (n = 7);
- 2-я группа — хирургическая модель 4 мес. (n = 8);
- 3-я группа — комбинированная модель 4 мес. (n = 8);
- 4-я группа — хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном (n = 8);
- 5-я группа — контроль 1 мес. (интактные) (n = 8);
- 6-я группа — контроль 2 мес. (интактные) (n = 7);
- 7-я группа — контроль 4 мес. (интактные) (n = 6).

Экстраполирование на соответствующие стадии полового развития у человека было следующим. Крысы 1 мес. жизни — допубертатный период у человека; крысы 2-месячного возраста — препубертатный период у человека; крысы 4-месячного возраста — период завершившегося полового созревания у человека. Была выделена группа (8 крыс) модели гипогонадизма с лечением тестостероном (в 4 мес. вводился тестостерон пропионат, 5 мг/кг/сут., курс лечения 10 сут.) [30]. Производили забор материала на разных сроках полового развития (гонады, мышечная ткань, кровь).

Критерии исключения: любые отклонения от стандартов линии Вистар — по массе, возрасту и видимым признакам.

Определение концентрации рецепторов киспептина KISS1-R в периферических стероидзависимых тканях (гонадах и мышцах) самцов крыс проводилось по следующей методике. На первом этапе осуществлялось получение супернатанта из гомогенизированных тканей. Образцы тканей были гомогенизированы на криогенной мельнице CryoMill-2L (Retsch, Германия) при температуре жидкого азота. Предварительно охлажденные пробы тканей (гонады — 1,5 мин охлаждение, мышцы — 2 мин охлаждение) подверг-

ли вибрационной гомогенизации с частотой 25 Гц (гонады — 3 мин дробление, мышцы — 4 мин дробление). Для выделения G-протеинсвязанного рецептора GPR54 из мембраны клеток, полученный гомогенат суспендировали в изотоническом фосфатном буфере, содержащем 0,5% Тритона 100, далее гомогенаты проб подвергали вибрационному воздействию в аппарате Vortex V-1 plus BioSan в течение 2—3 с и оставляли на 30 мин в холодильнике. Для получения супернатанта гомогенаты центрифугировали в центрифуге Microfuge 22R Centrifuge (Beckman Coulter, Германия) при температуре +4 градуса, на 12000 оборотов в течение 15 мин.

Концентрации рецепторов кисспептина KISS1-R в полученных супернатантах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием Elisa kit набора (MBS 2021161 Test Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Kisspeptin Receptor (Kiss1R), China) и сравнивали с приготовленными стандартами (с концентрацией 5 нг/мл, 2,5 нг/мл, 1,25 нг/мл, 0,625 нг/мл, 0,312 нг/мл, 0,156 нг/мл, 0 нг/мл) на аппарате вертикального оптического абсорбциометра-монохроматора BioTek Synergy 2 (USA). Полученные значения концентраций рецепторов GPR54 в тканях гонад и мышц пересчитывали с учетом концентрации белка в этих препаратах (количество рецепторов на мг белка) нг/мг. Для этого в полученных супернатантах проб определяли концентрацию белка по методу Варбурга при помощи вертикального оптического абсорбциометра-монохроматора BioTek Synergy 2. Концентрация белка определялась по сравнению с BSA (2,0 мг/мл) для каждого препарата. Концентрации кисспептина в плазме крови крыс определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием Elisa Kit набора (CSB-E1343r Test Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For the quantitative determination of rat kisspeptin-1 (KISS1), China) и сравнивали с приготовленными стандартами (с концентрацией 10 нг/мл, 5 нг/мл, 2,5 нг/мл, 1,25 нг/мл, 0,625 нг/мл, 0,312 нг/мл, 0,156 нг/мл, 0 нг/мл) на аппарате вертикального оптического абсорбциометра-монохроматора BioTek Synergy 2. Концентрацию тестостерона в плазме крови крыс определяли методом твердофазного иммуноферментного анализатора Synergy 2 (BioTek USA) с использованием Elisa Kit набора (CSB-E05100r Test Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For the quantitative determination of rat testosterone concentrations, China) и сравнивали с приготовленными стандартами (с концентрацией 25,6 нг/мл, 6,4 нг/мл, 2 нг/мл, 0,5 нг/мл, 0,13 нг/мл, 0 нг/мл) на аппарате вертикального оптического абсорбциометра-монохроматора BioTek Synergy 2.

В ходе подготовки и проведения эксперимента соблюдались принципы гуманного отношения к лабораторным животным в соответствии с «Руководящими методическими материалами по экспериментальному и клиническому изучению новых лекарственных средств» (1984), «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985) и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 2003 г. № 267).

Математическая обработка полученных данных (сравнение выборок) производилась методами непараметрического анализа с использованием W-критерия Вилкоксона. При значении W-критерия более 1,96 считали, что есть различия между выборками с уровнем значимости $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили посредством вычисления коэффициента корреляции r по Пирсону.

Результаты и обсуждение

Анализ изменений уровня тестостерона в крови показал следующее (табл. 1).

Исследование подтвердило значительные различия в уровне тестостерона у интактных крыс разного возраста. Так, у крыс в возрасте 1 и 2 мес. уровень тестостерона был значительно ниже (медиана (Me) соответственно 5,99 нг/мл и 14,29 нг/мл), чем у крыс в возрасте 4 мес. (Me 20,02 нг/мл, W-критерий 21,68, $p < 0,01$), что подтвердило пубертатные изменения половых стероидов в данных возрастных группах крыс. При оценке модели хирургического гипогонадизма получены данные о сопоставимости уровня тестостерона в модели с данными у препубертатных крыс 2 мес. (Me соответственно 15,39 нг/мл и 14,29 нг/мл, W-критерий 0,69, $p > 0,05$), при этом уровень тестостерона в хирургической модели крыс 4 мес. был значимо ниже, чем у интактных половозрелых самцов соответствующего возраста (Me 15,39 нг/мл против 20,02 нг/мл, W-критерий 2,86, $p < 0,01$). Полученные данные подтвердили корректность созданной модели хирургического гипогонадизма. При оценке комбинированной модели гипогонадизма также было подтверждено статистически значимое снижение уровня тестостерона, однако уровень последнего был настолько низким, что существенно отличался даже от уровня тестостерона в хирургической модели (соответственно Me 9,51 нг/мл и 15,39, W-критерий 3,24, $p < 0,01$). Это позволило сделать заключение о дифференцированном по степени тяжести моделировании гипогонадизма с наиболее тяжелым дефицитом тестостерона в комбинированной модели.

Таблица 1

Концентрация тестостерона в плазме крови самцов крыс (нг/мл)

Группы	Концентрация тестостерона в плазме (нг/мл)									W-критерий*	p
	11,2	10,85	3,14	2,55	0	0,37	8,43	11,42	5,99		
Контроль 1 мес. (n = 8)										** 21,68 *** 2,86	<0,01 <0,01
Контроль 2 мес. (n = 8)	14,02	12,56	8,22	12,7	16,17	17,73	16,91	16	14,29	**** 18,98 ***** 0,69	<0,01 >0,05
Хирургическая модель 2 мес. (n = 7)	10,17	11,92	16,03	18,25	13,88	8,94	15,03		13,46	***** 3,09 ***** 3,24 ***** 2,84 ***** 3,12	<0,01 <0,01 <0,01 <0,01
Контроль 4 мес. (n = 6)	17,94	20,19	17,96	20,7	21,05	22,27			20,02		
Хирургическая модель 4 мес. (n = 7)	15,61	14,21	13,96	14,22	14,6	17,96	17,19		15,39		
Комбинированная модель 4 мес. (n = 8)	11,3	10,78	11,21	10,14	5,95	5,96	7,77	12,89	9,51		
Хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном (n = 8)	21,19	26,43	26,33	25,84	26,35	26,25	26,25	26,44	26,26		

Примечание. * — W-критерий — критерий Уилкоксона; ** — сравнение "контроль 4 мес. — контроль 1 мес."; *** — сравнение "контроль 4 мес. — хирургическая модель 4 мес."; **** — сравнение "хирургическая модель 4 мес. — контроль 1 мес."; ***** — сравнение "хирургическая модель 4 мес. — контроль 2 мес."; ***** — сравнение "комбинированная модель 4 мес. — контроль 4 мес."; ***** — сравнение "комбинированная модель 4 мес. — хирургическая модель 4 мес."; ***** — сравнение "контроль 4 мес. — хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном"; ***** — сравнение "хирургическая модель 4 мес. — хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном"

Таблица 2

Концентрация кисспептина в плазме крови самцов крыс (нг/мл)

Группы	Концентрация кисспептина в плазме (нг/мл)									W-критерий*	p
	0,42	0,26	0,45	0,22	0,29	0,37			0,33		
Контроль 1 мес. (n = 6)										** 0,96 *** 0,14	>0,05 >0,05
Контроль 2 мес. (n = 7)	0,29	0,41	0,32	0,42	0,37	0,06	0,14		0,29	**** 0,43 ***** 1,29 ***** 0,89 ***** 1,29	>0,05 >0,05 >0,05 >0,05
Хирургическая модель 2 мес. (n = 5)	0,32	0,24	0,18	0,25	0,25				0,25		
Контроль 4 мес. (n = 6)	0,37	0,23	0,18	0,14	0,22	0,46			0,26		
Хирургическая модель 4 мес. (n = 7)	0,37	0,13	0,16	0,43	0,36	0,21	0,2		0,27		
Комбинированная модель 4 мес. (n = 8)	0,23	0,19	0,43	0,31	0,46	0,39	0,39	0,74	0,39		
Хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном (n = 5)	0,23	0,31	0,3	0,34	1,16				0,47		

Примечание. * — W-критерий — критерий Уилкоксона; ** — сравнение "контроль 4 мес. — контроль 1 мес."; *** — сравнение "контроль 4 мес. — контроль 2 мес."; **** — сравнение "контроль 4 мес. — хирургическая модель 4 мес."; ***** — сравнение "комбинированная модель 4 мес. — контроль 4 мес."; ***** — сравнение "хирургическая модель 4 мес. — хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном"; ***** — сравнение "контроль 4 мес. — хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном"

Впоследствии изучалось отдельно влияние степени тяжести гипогонадизма на состояние кисспептиновой системы. Лечение препаратами тестостерона привело к значительному возрастанию уровня этого гормона в плазме крови гипогонадных самцов (Me до лечения 15,39 нг/мл, Me после лечения 26,26 нг/мл, W-критерий 3,12, $p < 0,01$), при этом интересен факт, что уровень тестостерона плазмы гипогонадных самцов после лечения стал значительно выше, чем у интактных половозрелых самцов того же возраста (Me 26,26 нг/мл против Me 20,02 нг/мл в контроле, W-критерий 2,84, $p < 0,01$). Таким образом, терапия тестостероном не только повысила уровень этого гормона в плазме крови гипогонадных самцов крыс, но и сделала его существенно выше физиологического уровня у половозрелых самцов крыс группы контроля.

Что касается динамики белка кисспептина в плазме крови, то его уровень как в группе контроля у допубертатных крыс и половозрелых крыс, так и в группах крыс с обеими (хирургической и комбинированной) моделями гипогонадизма статистически не различался (табл. 2). Терапия тестостероном не приводила к изменению уровня кисспептина у гипогонадотропных крыс, который оставался сопоставимым с уровнем у интактных (нормогонадотропных) половозрелых крыс 4 мес. (Me у гипогонадотропных крыс 4 мес. 0,27 нг/мл, Me у нормогонадных крыс 4 мес. 0,26 нг/мл, W-критерий 0,43, $p > 0,05$).

В литературе приводятся данные о значимой роли системы кисспептина в активации/инактивации функциональной активности гонадной оси. Так, есть сведения, что у GPR54-нокаут мышей не наступала пульсаторная выработка ЛГ и ФСГ и не развивалась половая зрелость. С другой стороны, исследования Navarro VM et al. (2004) показали, что гонадэктомия увеличивала выработку Kiss1 mRNA в аркуатном ядре гипоталамуса крыс, в то время как назначение стероидной терапии повышенный уровень Kiss1 mRNA снижался [13]. Представлялось интересным изучить ассоциации изменений кисспептина и тестостерона в плазме крови как гипогонадных, так и интактных самцов крыс разного возраста и половой зрелости. Корреляционный анализ медианы кисспептина и тестостерона в группах интактных крыс в возрасте 1, 2 и 4 мес. показал сильную обратную зависимость ($r = 0,99$, $p < 0,01$), свидетельствующую о снижении плазменного уровня кисспептина при возрастании уровня тестостерона. Подобные обратные взаимосвязи данных показателей установлены в группах модели гипогонадизма (хирургическая модель, 2 и 4 мес., комбинированная модель, 4 мес): $r = 0,86$, $p < 0,05$. Сделано заключение, что, независимо от количественного содержания тестостерона и кисспептина

в плазме крови, направления их изменений носят противоположный характер по отношению друг к другу. Полученные данные были сопоставимы с данными литературы.

На следующем этапе исследования проводилось изучение количества и плотности кисспептиновых рецепторов KISS1R в стероидзависимых периферических тканях (мышцы, гонады). Сравнение плотности кисспептиновых рецепторов в гонадах (табл. 3) в группах контроля — интактных крыс допубертатного, 1 мес., и пубертатного, 4 мес., возраста показало значимое повышение их по достижении пубертата (Me 0,92 нг/мг против 1,13 нг/мг соответственно, W-критерий 2,6, $p < 0,01$), что подтверждало предположение об увеличении количества кисспептиновых рецепторов в возрасте пубертата в физиологических условиях. В модели гипогонадизма плотность KISS1R значительно снижалась по сравнению с нормогонадными самцами того же возраста (Me соответственно 0,88 нг/мг и 1,13 нг/мг, W-критерий 2,04, $p < 0,05$), при этом различий между гипогонадными половозрелыми крысами в 4 мес. и допубертатными интактными в 1 мес. по количеству рецепторов кисспептина не было выявлено (Me 0,88 нг/мг против 0,92 нг/мг, W-критерий 0,52, $p > 0,05$). Терапия тестостероном не приводила к повышению количества кисспептиновых рецепторов в гонадах гипогонадных крыс, они оставались статистически значимо ниже, чем в контроле того же возраста (Me соответственно 0,79 нг/мг и 1,13 нг/мг, W-критерий 2,68, $p < 0,01$). Сравнение в группах гипогонадизма до и после лечения тестостероном показало, что количество кисспептиновых рецепторов не претерпевало существенных различий у гипогонадных и пролеченных тестостероном крыс одного возраста (Me соответственно 0,88 нг/мг и 0,79 нг/мг, W-критерий 0,69, $p > 0,05$). Сделано заключение, что при индуцированном гипогонадизме количество рецепторов KISS1R в гонадах сокращалось до допубертатного уровня и не повышалось даже на фоне терапии тестостероном.

В то же время при оценке плотности рецепторов к кисспептину в мышечной ткани результаты были иными (табл. 4). Следует отметить, что, несмотря на несомненную принадлежность мышечной ткани к числу стероидзависимых, сравнение плотности KISS1R рецепторов в гонадах и мышцах показало значительно более низкую представленность данной группы рецепторов в последней. Так, медианы плотности KISS1R в группах интактных самцов крыс допубертатного возраста (1 мес.) составили соответственно в гонадах 0,784 нг/мг, в мышцах 0,114 нг/мг белка, что свидетельствовало о статистически более высокой плотности рецепторов в гонадах (W-критерий 2,88, $p < 0,01$). Подобные результаты были по-

лучены у половозрелых интактных крыс — Me KISS1R в гонадах 1,17 нг/мг, в мышцах — 0,11 нг/мг белка (W-критерий 2,61, $\rho < 0,01$). Таким образом, в физиологических условиях плотность киспептиновых рецепторов в гонадах самцов крыс значительно выше, чем в мышцах, независимо от возраста и стадии полового развития.

Вероятно, данный факт способен объяснить несущественные различия плотности KISS1R в мышечной ткани как допубертатных и половозрелых интактных крыс, так и гипогонадных самцов крыс в модели хи-

рургического гипогонадизма, причем различия отсутствовали как внутри интактных групп контроля, так и между контрольной и исследуемой группой опыта. Различий в количестве рецепторов в мышцах хирургической модели гипогонадизма и допубертатными ($\rho > 0,05$), пубертатными нормогонадными крысами (Me 0,1 нг/мг против 0,12 нг/мг, W-критерий 0,18, $\rho > 0,05$) не было обнаружено.

Лечение тестостероном не увеличивало количество KISS1R в мышцах крыс — сравнение группы гипогонадных крыс 4 мес. и группы с лечением тестостероном

Таблица 3

Концентрация рецепторов киспептина в гонадах крыс, нг/мг белка

Группы	Концентрация рецепторов к киспептинам (нг/мг белка)								Медиана	W-критерий*	р
Контроль 1 мес. (n = 6)	0,73	0,84	0,53	0,7	0,89	1,89			0,92	** 2,05 *** 2,68	<0,05 <0,01
Контроль 4 мес. (n = 5)	1,24	1,17	0,92	1,23	1,15				1,13	**** 1,83 ***** 0,69 ***** 0,52	>0,05 >0,05 >0,05
Хирургическая модель 4 мес. (n = 8)	0,85	0,81	0,8	0,7	0,81	0,86	1,3	0,94	0,88		
Комбинированная модель 4 мес. (n = 7)	0,89	1,23	0,94	0,83	0,72	0,76	0,89		0,86		
Хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном (n = 7)	0,71	0,62	0,73	0,98	0,9	0,87	0,76		0,79		

Примечание. * — W-критерий — критерий Уилкоксона; ** — сравнение "контроль 4 мес. — хирургическая модель 4 мес."; *** — сравнение "контроль 4 мес. — хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном"; **** — сравнение "контроль 4 мес. — контроль 1 мес."; ***** — сравнение "хирургическая модель 4 мес. — хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном"; ***** — сравнение "хирургическая модель 4 мес. — контроль 1 мес."

Таблица 4

Концентрация рецепторов киспептина в мышцах крыс, нг/мг белка

Группы	Концентрация рецепторов к киспептинам (нг/мг белка)								Медиана	W-критерий*	р
Контроль 1 мес. (n = 6)	0,19	0,16	0,1	0,07	0,1	0,12			0,12	** 1,28 *** 0,29 **** 0	>0,05 >0,05 >0,05
Контроль 4 мес. (n = 5)	0,11	0,11	0,11	0,1	0,12				0,11	***** 2,84 ***** 0,18 ***** 0,18	<0,01 >0,05 >0,05
Хирургическая модель 4 мес. (n = 6)	0,04	0,19	0,08	0,11	0,09	0,1			0,1		
Комбинированная модель 4 мес. (n = 7)	0,04	0,02	0,06	0,06	0,07	0,09	0,07		0,06		
Хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном (n = 8)	0,08	0,19	0,12	0,08	0,13	0,07	0,11	0,06	0,11		

Примечание. * — W-критерий — критерий Уилкоксона; ** — сравнение "контроль 4 мес. — хирургическая модель 4 мес."; *** — сравнение "контроль 4 мес. — хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном"; **** — сравнение "хирургическая модель 4 мес. — хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном"; ***** — сравнение "контроль 4 мес. — комбинированная модель 4 мес."; ***** — сравнение "хирургическая модель 4 мес. — контроль 1 мес."; ***** — сравнение "хирургическая модель 4 мес. — контроль 1 мес."

не показало значимых различий (Ме соответственно 0,1 нг/мг и 0,11 нг/мг, W-критерий 0,29, $p > 0,05$).

Только в модели комбинированной хирургической и химической кастрации значимо уменьшалось количество киспептиновых рецепторов в мышцах по сравнению как с нормогонадными половозрелыми крысами (Ме 0,06 нг/мг и 0,11 нг/мг соответственно, W-критерий 2,84, $p < 0,01$), так и по сравнению с хирургической моделью гипогонадизма в возрасте 4 мес. (Ме 0,06 нг/мг и 0,1 нг/мг, W-критерий 2,14, $p < 0,05$). Учитывая, что ранее было показано, что степень снижения тестостерона в комбинированной модели значительно более выражена, свидетельствуя о более глубоком угнетении гонадной оси и большей тяжести гипогонадизма, можно высказать предположение о том, что в физиологически менее насыщенной киспептиновыми рецепторами мышечной ткани изменение периферического киспептинового статуса носит «тяжесть-зависимый» характер. Иными словами, снижение плотности KISS1R в мышцах ассоциировано с тяжелой степенью дефицита андрогенов.

Таким образом, на данном этапе исследования были получены сведения о киспептиновом сигналинге в периферических стероидзависимых тканях при физиологическом развитии пубертата и в условиях патологии — при мужском гипогонадотропном гипогонадизме.

Подводя общие итоги проведенной исследования, считаем важным подчеркнуть следующее. Основной идеей проведенного исследования явилось изучение роли киспептинового сигналинга, играющего важную роль в физиологической регуляции гонадной оси, в части его влияния на периферические стероидзависимые ткани. Для расширения понимания механизмов патологии и поиска новых терапевтических возможностей при нарушениях полового развития детей и подростков в данной работе исследования проводились на экспериментальной модели мужского гипогонадотропного гипогонадизма.

Обсуждая полученные результаты, следует отметить, что при физиологическом половом развитии у самцов крыс контрольной группы были установлены значительные различия в представленности киспептиновых рецепторов в разных стероидзависимых тканях. Так, в гонадах плотность KISS1R значительно выше по сравнению с мышечной тканью, причем в последней, наряду с очень низкой представленностью, плотность KISS1R не меняется в зависимости от возраста и стадии полового развития, являясь сопоставимой у самцов в препубертате и завершивших пубертат. В отличие от этого, в гонадах плотность KISS1R статистически значимо возрастает за период от препубертата к моменту завершения полового созревания. Так как было показано, что при этом зна-

чительно возрастает уровень тестостерона плазмы крови, можно сделать заключение об однонаправленных изменениях (возрастании) тестостерона и плотности рецепторов к киспептину на тканевом уровне. Что касается концентрации собственно белка киспептина в другой биологической среде — плазме крови, то уровень его как у интактных крыс контрольной группы разных возрастов и стадий полового развития, так и в группах модели гипогонадотропного гипогонадизма, оставался крайне низким, не имея различий в зависимости от содержания тестостерона. Корреляционный анализ содержания киспептина и тестостерона как в контрольной, так и в опытной группе показал наличие сильной обратной связи, свидетельствуя о тенденции к снижению уровня киспептина плазмы при возрастании уровня тестостерона. Было сделано заключение, что, в отличие от изменений на тканевом уровне, где плотность киспептиновых рецепторов изменяется однонаправленно с уровнем тестостерона, в крови данные ассоциации носят разнонаправленный характер. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными, свидетельствовавшими, что при старте стероидной терапии снижается KISS1 mRNA [13].

Анализируя результаты в группе самцов крыс с индуцированным гипогонадотропным гипогонадизмом, было установлено, что уровень тестостерона был статистически значимо снижен как в модели хирургического, так и в модели комбинированного (хирургического + медикаментозного) гипогонадизма по сравнению с контрольной группой половозрелых самцов соответствующего возраста. Однако были отмечены статистически значимые различия также внутри групп экспериментального гипогонадизма, свидетельствующие о более низких значениях тестостерона в комбинированной модели. Данный факт позволил говорить о дифференцированном по степени тяжести гипогонадизме с более тяжелым вариантом в комбинированной модели. Гипогонадотропный гипогонадизм обеих моделей был ассоциирован со снижением плотности киспептиновых рецепторов в гонадах, в которых последняя снижалась до плотности у самцов допубертатного возраста. Что касается плотности KISS1R в мышцах, то лишь в модели комбинированного, то есть наиболее тяжелого, гипогонадизма было установлено статистически значимое их снижение; хирургическая же модель, равно как и разный уровень полового развития у интактных крыс контрольной группы, не приводили к более или менее существенным изменениям представленности киспептиновых рецепторов в этой ткани.

Что касается результатов терапии тестостероном гипогонадных самцов крыс (проводилось введение его по «острой» схеме введения), то было констати-

ровано его значительное повышение в плазме крови, статистически значимое по сравнению с уровнем до введения. Более того, уровень тестостерона крови после его введения оказался статистически значимо выше такового у интактных половозрелых самцов крыс группы контроля. Однако, несмотря на восстановление высоких пубертатных значений тестостерона в крови, изменений плотности KISS1R в стероидзависимых тканях (гонады и мышцы) не произошло, что позволило сделать заключение, о неэффективности терапии тестостероном в плане восстановления кисспептиновых рецепторов, по крайней мере в примененной дозе и схеме введения. Для уточнения возможностей заместительной терапии требуется продолжение исследований в данном направлении.

Транслируя полученные в эксперименте результаты на клиническую практику, представляется логичным сформулировать следующие заключения, носящие гипотетический характер. Несмотря на тот факт, что участие системы KISS-KISS1R является несомненно значимым в осуществлении регуляторных механизмов гонадной оси на уровне периферических стероидзависимых тканей, роль определения уровня белка кисспептина в плазме крови в качестве диагностического маркера гипогонадизма, представляется малоинформативной. При этом понимание отсутствия количественных изменений тканевых кисспептиновых рецепторов при гипогонадизме в ответ на стандартную заместительную терапию тестостероном обосновывает показания к поиску новых терапевтических возможностей, включая заместительную терапию аналогами кисспептинов.

Выводы

1. При физиологическом варианте полового развития установлена различная плотность кисспептиновых рецепторов в стероидзависимых тканях: наиболее высокая в ткани гонад и существенно более низкая в мышечной ткани. Концентрация белка кисспептина в крови самцов крыс является стабильно низкой, независимо от уровня андрогенизации, не отражая, таким образом, степени полового развития как при нормальном, так и при патологическом его течении.

2. Уровень тестостерона в физиологических условиях оказывает разнонаправленное влияние на систему кисспептина в различных биологических средах: в крови при повышении тестостерона отмечается снижение белка кисспептина, в то время как в андрогензависимых тканях (гонады) повышение уровня тестостерона сопровождается увеличением плотности кисспептиновых рецепторов.

3. Гипогонадизм, не оказывая существенного влияния на концентрацию кисспептина в крови, приводит

к снижению плотности рецепторов кисспептина в периферических стероидзависимых тканях (гонадах и скелетных мышцах), достигающей допубертатного уровня, причем на уровне мышечной ткани данный эффект носит дозозависимый характер и реализуется только при тяжелой степени дефицита андрогенов.

4. Терапия гипогонадизма тестостероном, восстанавливая его уровень в крови, не приводит к значимому изменению плотности кисспептиновых рецепторов в гонадах и мышцах, по крайней мере в использованных дозе и схеме введения. Для уточнения терапевтических возможностей терапии тестостероном требуются дальнейшие исследования.

5. Транслируя результаты экспериментального исследования на клиническую практику, следует отметить, что, несмотря на очевидные изменения кисспептинового сигналинга при гипогонадотропном гипогонадизме на уровне стероидзависимых тканей, определение уровня кисспептина в плазме крови в качестве диагностического маркера представляется малоинформативным ввиду несущественных различий в физиологических условиях на разных стадиях полового развития. Что касается эффективности используемой в настоящее время для терапии гипогонадизма заместительной терапии половыми стероидами, то отсутствие влияния высокой концентрации тестостерона в крови на количество и плотность кисспептиновых рецепторов в стероидзависимых тканях предиктирует целесообразность поиска новых терапевтических возможностей, к которым может относиться, в том числе, применение аналогов кисспептина.

References

1. Sapronov N.S. *GnRH. Gonadoliberin. [Gonadoliberinu]*. S.-Petersburg: Art-ekspress; 2012. (in Russian)
2. Sorensen K., Mouritsen A., Aksglaede L., Hagen C.P., Mogensen S.S., Juul A. Recent secular trends in pubertal timing: implications for evaluation and diagnosis of precocious puberty. *Horm. Res. Paediatr.* 2012; 77(3):137-145. Doi: 10.1159/000336325.
3. Nikitina I.L. The timing of puberty: well-known and new. *Arterial'naya gipertenziya.* 2013; 19(3): 227-236. (in Russian)
4. Krsmanovic L.Z., Hu L., Leung P.K., Feng H., Catt K.J. Pulsatile GnRH secretion: roles of G protein-coupled receptors, second messengers and ion channels. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010; 314(2): 158-63. Doi: 10.1016/j.mce.2009.05.015.
5. Parent A.S., Teilmann G., Juul A., Skakkebaek N.E., Toppari J., Bourguignon J.P. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr. Rev.* 2003; 24(5): 668-93.
6. Ojeda S.R., Lomniczi A., Sandau U., Matagne V. New concepts on the control of the onset of puberty. *Endocr. Dev.* 2010; 17: 44-51. Doi: 10.1159/000262527.
7. Tena-Sempere M. Kisspeptin signaling in the brain: recent developments and future challenges. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010; 314(2): 164 -169. Doi: 10.1016/j.mce.2009.05.004.

8. Javed Z., Qamar U., Sathyapalan T. The role of kisspeptin signalling in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis — current perspective. *Endokrynol. Pol.* 2015; 66(6): 534-47. Doi: 10.5603/EP.2015.0066.
9. Yang L., Dhillon W. Kisspeptin as a therapeutic target in reproduction. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2016; 20(5): 567-75. doi: 10.1517/14728222.2016.1124858.
10. Lee J.H., Miele M.E., Hicks D.J., Phillips K.K., Trent J.M., Weissman B.E. et al. KISS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996; 88(23): 1731-7.
11. de Roux N., Genin E., Carel J.C., Matsuda F., Chaussain J.L., Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KISS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100(19): 10972-6.
12. Nikitina I.L., Bayramov A.A., Khoduleva Yu.N., Shabanov P.D. Kisspeptins in physiology and pathology of sex development — new diagnostic and therapeutic approaches. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii.* 2014; 12(4): 3-12. (in Russian)
13. Navarro V.M., Castellano J.M., Fernandez- Fernandez R., Barreiro M.L., Roa J., Sanchez-Criado J.E. et al. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology.* 2004; 145(10): 4565-74.
14. Nimri R., Lebenthal Y., Lazar L., Chevrier L., Phillip M., Bar M. et al. A novel loss-of-function mutation in GPR54/KISS1R leads to hypogonadotropic hypogonadism in a highly consanguineous family. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011; 96(3): 536-45. Doi: 10.1210/jc.2010-1676.
15. Goodman R.L., Lehman M.N., Smith J.T., Coolen L.M., de Oliveira C.V., Jafarzadehshirazi M.R. et al. Kisspeptin nucleus in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology.* 2007; 148(12): 5752-60.
16. Topaloglu A.K., Reimann F., Guclu M., Yalin A.S., Kotan L.D., Porter K.M. et al. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat. Genet.* 2009; 41(3): 354-8. Doi: 10.1038/ng.306.
17. Young J., George T., Tello J. A., Francou B., Bouligand J., Guiochon-Mantel A. et al. Kisspeptin restores pulsatile LH secretion in patients with neurokinin B signaling deficiencies: physiological, pathophysiological and therapeutic implications. *Neuroendocrinology.* 2013; 97(2): 193-202. Doi: 10.1159/000336376.
18. Leon S., Barroso A., Vazquez M.J., Garcia-Galiano D., Manfredi-Lozano M., Ruiz-Pino F. et al. Direct Actions of Kisspeptins on GnRH Neurons Permit Attainment of Fertility but are Insufficient to Fully Preserve Gonadotropic Axis Activity. *Sci. Rep.* 2016; 6: 19206. Doi: 10.1038/srep19206.
19. Brown R.E., Imran S.A., Ur E., Wilkinson M. KiSS-1 mRNA in adipose tissue is regulated by sex hormones and food intake. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2008; 281(1-2): 64-72.
20. Tng E.L. Kisspeptin signalling and its roles in humans. *Singapore Med. J.* 2015; 56(12): 649-56. Doi: 10.11622/smedj.2015183.
21. Celik O., Celik N., Aydin S., Aygun B.K., Haberal E.T., Kulodlu T. et al. Ghrelin action on GnRH neurons and pituitary gonadotropes might be mediated by GnRH-GPR147 system. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 2016; 25(2): 121-8. Dcoi: 10.1515/hmbci-2015-0050.
22. Pinilla L., Aguilar E., Dieguez C., Millar R.P., Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 2012; 92(3): 1235-316. doi:10.1152/physrev.00037.2010.
23. Guerriero K.A., Keen K.L., Millar R.P., Terasawa E. Developmental changes in GnRH release in response to kisspeptin agonist and antagonist in female rhesus monkeys (Macaca mulatta): implication for the mechanism of puberty. *Endocrinology.* 2012; 153(2): 825-36. Doi: 10.1210/en.2011-1565.
24. Roseweir A.K., Kauffman A.S., Smith J.T., Guerriero K.A., Morgan K., Pielecka-Fortuna J. et al. Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J. Neurosci.* 2009; 29(12): 3920-9. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.5740-08.2009.
25. George J.T., Veldhuis J.D., Roseweir A.K., Newton C.L., Faccenda E., Millar R.P. et al. Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011; 96(8): 1228-36. Doi: 10.1210/jc.2011-0089.
26. Newton C.L., Anderson R.C., Millar R.P. Therapeutic Neuroendocrine Agonist and Antagonist Analogs of Hypothalamic Neuropeptides as Modulators of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis. *Endocr. Dev.* 2016; 30: 106-129. Doi: 10.1159/000439337.
27. Kirshenblat Ya.D. *Manual of endocrinology. [Praktikum po endokrinologii].* Moscow: Vysshaya shkola; 1969. (in Russian)
28. Gorski R.A. Hypothalamic imprinting by gonadal steroid hormones. *Advances in experimental medicine and biology.* 2002; 511: 57-70.
29. Filippi S., Luconi M., Granchi S., Vignozzi L., Bettuzzi S., Tozzi P. et al. Estrogens, But Not Androgens, Regulate Expression and Functional Activity of Oxytocin Receptor in Rabbit Epididymis. *Endocrinology.* 2002; 143(11): 4271-80.
30. Bairamov A.A., Poletaeva A.O., Proshin S.N., Efremov O.M., Saprionov N.S. Sexual Function in Adult Male Rats after Prenatal Modulation of the Cholinergic System. *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 2009; 39(5): 463-70.

Сведения об авторах:

Ходулева Юлия Николаевна, мл. науч. сотр. НИЛ детской эндокринологии, ассистент каф. детских болезней, врач, e-mail: dom-j@mail.ru

Масель Алиса Сергеевна, клинический ординатор каф. детских болезней; врач, e-mail: masel.alisa@gmail.com

Байрамов Алекбер Азизович, доктор мед. наук, врач, e-mail: alekber@mail.ru

Шабанов Петр Дмитриевич проф., доктор мед. наук, вед. науч. сотр. НИЛ детской эндокринологии, e-mail: shabanov@mail.rcm.ru

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616-092

Шакова Ф.М.¹, Калинина Т.И.², Гуляев М.В.³, Черемных А.М.², Юрин В.Л.², Романова Г.А.¹

Нейропротективный и антиамнестический эффекты мутантных молекул эритропоэтина на модели фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга крысы

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

² — ФГУП Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1

³ — Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119192, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 31, к. 5

Методика. Методом геной инженерии созданы мутантные молекулы ЕРО, лишённые эритропоэтической активности, но обладающие цитопротекторным действием. Оценка терапевтической эффективности полученных мутантных белков проводилась по степени сохранения условного рефлекса пассивного избегания (ЛП УРПИ), выработанного до ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга крыс, а также на основе МРТ-анализа объёма ишемического повреждения. Исследовано антиамнестическое и нейропротективное действие мутантных молекул — МЕРО-Fc и МЕРО-TR на модели фототромбоза префронтальной коры мозга крыс при однократном интраназальном введении через 1 ч после ишемического повреждения коры. **Результаты.** Показаны нейропротективный (МРТ) и антиамнестический (ЛП УРПИ) эффекты мутантных молекул производных эритропоэтина.

Ключевые слова: фототромбоз; префронтальная кора; мутантные молекулы эритропоэтина МЕРО-TR, МЕРО-Fc; интраназальное введение; МРТ; УРПИ; нейропротективный и антиамнестический эффект

Для цитирования: Шакова Ф.М., Калинина Т.И., Гуляев М.В., Черемных А.М., Юрин В.Л., Романова Г.А. Нейропротективный и антиамнестический эффекты мутантных молекул эритропоэтина на модели фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга крысы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 34–38.

Для корреспонденции: Шакова Фатима Мухамедовна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы ФГБНУ НИИОПП, e-mail: shakova.fatima@yandex.ru.

Финансирование. Работа поддержана субсидией Президиума РАН по программе «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» на 2014—2016 гг.

Конфликт интересов: отсутствует.

Поступила: 07.09.2016

Shakova F.M.¹, Kalinina T.I.², Gulyaev M.V.³, Cheremnykh A.M.², Yurin V.L.², Romanova G.A.¹

Neuroprotective and antiamnesic effects of mutant molecules of erythropoietin on model of photochemical thrombosis of rat brain prefrontal cortex

¹ — FSBI Institute of General Pathology and Pathophysiology, 125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

² — State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, 117545, Moscow, 1-st Dorozhnyi pr., 1

³ — MSU, Faculty of Fundamental Medicine, 117192, Moscow, 31-5, Lomonosovsky Prospekt

Mutant EPO molecules, deprived of erythropoietic activity, but possessing cytoprotective action, were created by the method of genetic engineering. The assessment of the therapeutic effectiveness of the received mutant proteins was carried out by the retention of the conditioned reflex of passive avoidance (PA), developed before the ischemic injury of rat brain prefrontal cortex, and by the MRI-analysis of ischemic damage volume. Antiamnesic and neuroprotective action of mutant molecules — MERO-Fc and MERO-TR is investigated on model of photothrombosis of rat brain prefrontal cortex at single intranasal introduction in 1 h after cortex ischemic damage. The neuroprotective (MRI) and antiamnesic (PA) effects of mutant molecules of erythropoietin derivatives are shown.

Keywords: photothrombosis; the prefrontal cortex; mutant erythropoietin molecules МЕРО-TR, МЕРО-Fc; intranasal administration; MRI; PA; neuroprotective and antiamnesic effect.

For citation: Shakova F.M., Kalinina T.I., Gulaev M.V., Cheremnykh A.M., Yurin V.L., Romanova G.A. Neuroprotective and anti-amnesic effects of mutant erythropoietin molecules on model photochemical thrombosis of prefrontal cortex in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (4): 34–38. (in Russ.).

For correspondence: Shakova F.M., e-mail: shakova.fatima@yandex.ru

Funding: The work was supported by Grant of the Presidium of RAS «Fundamental research for the development of biomedical technology» on 2014–2016 years.

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

Funding.

Received 07.09.2016

Введение

Приоритетным направлением в лечении ишемического инсульта признается нейропротективная терапия, направленная на поддержание метаболизма мозга. Использование препаратов нейрометаболического действия повышает устойчивость нейронов в условиях недостаточности кровоснабжения и кислородного голодания.

Одной из экспериментальных моделей, наиболее полно воспроизводящей клиническую картину фокального ишемического инфаркта мозга, является фотохимический тромбоз кровеносных сосудов коры. Использование данной модели дает возможность количественной оценки нейропротективного и антиамнестического действия препаратов, используемых для фармакологической коррекции ишемической патологии мозга [1–3].

Важной задачей современной медицины является разработка лекарственных средств, снижающих степень нейродегенерации, улучшающих функции ЦНС, и характеризующихся при этом быстрым способом доставки действующего вещества до органа-мишени и высокой биодоступностью. В связи с этим представляется перспективным изучение интраназального пути введения препаратов, теоретические и практические основы которого разрабатываются уже более 30 лет. Установлено, что при интраназальном применении лекарств большая их часть всасывается в кровь, меньшая — при помощи перинеурального транспорта по чувствительным нервам попадает непосредственно в мозг через нейроны обонятельного тракта и далее распространяется по структурам головного мозга при помощи механизмов, не связанных с кровотоком. Возможность прямого поступления лекарств в мозг и непосредственно в зону поражения, минуя гематоэнцефалический барьер, открывает новые перспективы для эффективного лечения цереброваскулярных и нейродегенеративных заболеваний ЦНС. Разработка и внедрение новых лекарственных препаратов с нейропротекторной активностью позволит оптимизировать подходы к лечению последствий ишемического инсульта.

На модели очагового ишемического инсульта ранее были проведены доклинические испытания карбамиллированных форм новых гибридных белков на основе ЕРО [4–7]. Было показано, что данная химическая модификация как ЕРО, так и его производных (ЕРО-TR и ЕРО-Fc) ведёт к потере эритропоэтической активности, при сохранении нейропротекторного действия [5]. Для активации цитопротекции, в отличие от эритропоэза, требуются значительно более высокие дозы ЕРО. Применение высоких доз вызывает повышение уровней гематокрита и тромбоцитов, что может быть связано с серьёзными побочными эффектами.

Представляется интересной и практически важной задачей создание новых мутантных форм ЕРО, не стимулирующих эритропоэз, но способных инициировать цитопротекцию. Известно, что молекула ЕРО имеет два сайта при последовательном взаимодействии с гоморецептором, участвующим в эритропоэзе. Ранее было показано, что замена аргинина в 103 положении в молекуле эритропоэтина приводит к потере способности инициировать пролиферацию эритроцитов, но позволяет сохранить цитопротекторные свойства [8]. Важно было исследовать влияние этой замены в производных, разработанных нами ранее (ЕРО-TR и ЕРО-Fc). Методом геной инженерии созданы мутантные молекулы ЕРО, несущие замену (R103A), как в виде мономера ЕРО-TR, так и димера в форме рекомбинантного белка с Fc-фрагментом иммуноглобулина, сформированного за счёт димеризации двух Fc-фрагментов. С использованием полученных плазмид, несущих гены мутантных ЕРО, и техники Flp/FRT сайт-специфической интеграции трансгенов в геном Flp-In/CHO клеток-реципиентов были созданы CHO линии-продуценты соответствующих мутантных белков. После селекции с помощью гигромицина были получены стабильно-трансфицированные линии клеток CHO, способные секретировать мутантные белки. Для наработки белковых соединений проводилось культивирование линий-продуцентов, с последующим получением очищенных образцов рекомбинантных белков из культуральных жидкостей методами

афинной хроматографии. Эритропоэтическая активность полученных мутантных гибридных белков оценена в тестах *in vitro*, где производилась оценка способности очищенных мутантных белков инициировать пролиферацию УТ-7еро клеток, чувствительных к ЕРО в сравнении со стандартным препаратом ЕРО. Анализ полученных данных показал, что способность взаимодействовать с рецептором и соответственно вызывать пролиферацию УТ-7еро клеток, редуцирована в 1000 и более раз у мутанта, содержащего замену R103E в контексте мономера ЕРО. В случае димерных молекул с молекулой Fc, способность вызывать пролиферацию была снижена в 100 раз. Таким образом, созданы мутантные молекулы эритропоэтина в контексте ЕРО-TR и ЕРО-Fc с сильно редуцированной эритропоэтической активностью. Получение препаратов таких белков не требует дополнительной химической модификации, что делает процесс более воспроизводимым и менее трудоёмким с точки зрения биотехнологического производства.

Цель исследования — изучение на модели фототромбоза сосудов префронтальной коры мозга крыс и определение дозозависимости нейропротективного и антиамнестического эффектов мутантных белков эритропоэтина — МЕРО-Fc и МЕРО-TR при однократном интраназальном введении.

Методика

Опыты выполнены на 60 нелинейных белых крысах-самцах массой 200—220 г, выращенных в питомнике ФГБНУ НИИОПП и содержавшихся в виварии при свободном доступе к пище и воде и естественной смене светового режима. Все эксперименты проводились в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными МЗ РФ № 708 от 23.08.2010 г.

Введение исследуемых мутантных форм производных эритропоэтина осуществлялось однократно, интраназально в дозах 50 мкг/кг и 10 мкг/кг через 1 ч после двустороннего фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс.

Все экспериментальные животные были разделены на 5 групп:

Интраназальное введение исследуемых веществ:

1. Фототромбоз + МЕРО-TR в дозе 50 мкг/кг (n = 12);
2. Фототромбоз + МЕРО-Fc в дозе 50 мкг/кг (n = 12);
3. Фототромбоз + МЕРО-TR в дозе 10 мкг/кг (n = 12);
4. Фототромбоз + МЕРО-Fc в дозе 10 мкг/кг (n = 12);

5. Фототромбоз + 0,9% раствор NaCl в объеме 50 мкл (n = 12).

Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ) вырабатывали по ранее описанной схеме [9]. Определяли латентный период (ЛП) — время, которое проходило от начала теста до момента пересечения крысой отверстия, разделяющего освещенный и темный отсеки камеры. При повторном заходе крысы в темный отсек камеры дверь в него закрывали и через металлические прутья пола пропускали электрический ток (1,3 мА, 50 Гц, 5 с). УРПИ считали выработанным, если ЛП составлял не менее 300 с. Животных с меньшим ЛП исключали из эксперимента. Оценку антиамнестического действия исследуемых мутантных белков проводили на 4-е сут. после индукции инфаркта коры.

Двустороннее фокальное ишемическое повреждение префронтальной коры головного мозга крыс (циртоархитектонические поля Frl и Fr2) создавали методом фотохимического тромбоза [10, 11]. Операцию проводили под наркозом (внутрибрюшинное введение хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг). После введения фотосенсибилизирующего красителя бенгальского розового (внутривенно 40 мг/кг, «Sigma», USA) голову крысы фиксировали в стереотаксисе. Для облучения использовали специальную установку, состоящую из источника холодного света — галогеновой лампы мощностью 250 Вт и световода с диаметром внутреннего сечения 3,0 мм. Световод устанавливали на расстоянии 1,0 мм от поверхности черепа, на 2,0 мм роstralнее брегмы и на 2,0 мм латеральнее сагиттального шва и облучали через кость черепа каждое из полушарий мозга холодным светом длиной волны 560 нм в течение 15 мин.

Головной мозг всех экспериментальных животных, предварительно наркотизированных хлоралгидратом в дозе 300 мг/кг в/б, исследовали с помощью МРТ на 4-е сут. после фототромбоза. Сканирование головного мозга производили на магнитно-резонансном томографе (МРТ) BioSpec 70/30 USR фирмы Bruker (Germany) с постоянным магнитным полем 7 Тл и с градиентной системой 105 мТл/м. Морфометрический анализ МРТ изображений проводили в программе ImageJ 1.38x (National Institutes of Health, USA) [12].

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Statistica 6.0. Для сравнения показателей латентного периода в тесте УРПИ использовали U-критерий Манна—Уитни для независимых выборок и критерий Вилкоксона для связанных выборок. Статистическую значимость различий объемов инфаркта оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

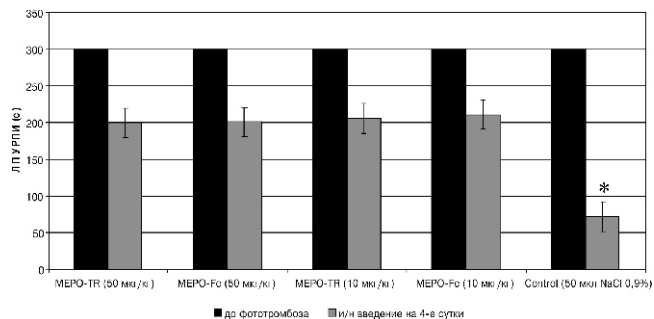
Ранее было показано, что фотохимически индуцируемый двусторонний тромбоз кровеносных сосудов в префронтальной области коры головного мозга крыс приводит к формированию ишемического очага, который захватывает всю толщу коры и отделен от окружающей неповрежденной ткани четко выраженной границей, такое повреждение коры сопровождается потерей выработанного до ишемии условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) [4, 13].

Оценку функционального состояния ЦНС проводили по показателям ЛП УРПИ до и после ишемического повреждения коры головного мозга крыс. До фототромбоза у всех обученных экспериментальных животных этот показатель составлял 300 с. Проверку сохранения выработанных до ишемии УРПИ проводили на 4-е сут. после операции.

Важной особенностью интраназального введения лекарственных препаратов является возможность их проникновения непосредственно в ЦНС. Предполагается, что транспорт лекарственных средств из полости носа в ЦНС осуществляется без участия слизистой, экстрацеллюлярным путем по ходу тройничного и обонятельного нервов. Уже через 10—15 мин химические агенты, введенные интраназально, обнаруживаются в мозге. Данный факт привлекает всеобщее внимание, поскольку обеспечивает новые возможности в лечении заболеваний ЦНС. Теоретически лекарственные препараты проникают в головной мозг только из обонятельной области, где существует возможность экстра — и интрацеллюлярного проникновения препаратов через эпителиальный барьер и попадания их не в кровоток, а непосредственно к оболочкам мозга [14].

При однократном интраназальном введении мутантных производных эритропоэтина, ЛП УРПИ на 4-е сут. после ишемии при введении МЕРО-TR в дозе 50 мкг/кг составил 200 с, МЕРО-Fc в дозе 50 мкг/кг — 201 с, МЕРО-TR в дозе 10 мкг/кг — 206 с, МЕРО-Fc в дозе 10 мкг/кг — 211 с, контрольная группа, получавшая 50 мкл NaCl 0,9% — 72 с.

Полученные данные показали достоверное сохранение выработанного до ишемии УРПИ при введении как МЕРО-TR, так и МЕРО-Fc. Антиамнестический эффект сохранялся при пятикратном снижении дозы



Влияние интраназального введения мутантных форм белков — МЕРО-TR и МЕРО-Fc на сохранение УРПИ у крыс с двусторонним фототромбозом префронтальной коры.

По оси абсцисс: группы экспериментальных животных: МЕРО-TR (50 мкг/кг), МЕРО-Fc (50 мкг/кг), МЕРО-TR (10 мкг/кг), МЕРО-Fc (10 мкг/кг), Control (50 мкл NaCl 0,9%). Темные столбики — показатели группы до фототромбоза, серые столбики — показатели группы после однократного интраназального введения вещества на 4-е сут. после фототромбоза.

По оси ординат: латентный период условного рефлекса пассивного избегания соответствующих экспериментальных групп в секундах.

* $p < 0,01$ по сравнению с соответствующим значением ЛП до фототромбоза (Критерий Вилкоксона).

препаратов, что доказывает эффективность интраназального способа введения, позволяющего существенно снизить дозу вводимого препарата (рисунок).

Объем повреждения мозговой ткани оценивали методом МРТ на 4-е сут. после фототромбоза (таблица).

При интраназальном способе введения, наиболее выраженный защитный эффект выявлен у МЕРО-Fc в дозировке 50 мкг/кг ($p < 0,05$), несколько ниже, но также статистически значимым, он оказался у МЕРО-Fc в дозировке 10 мкг/кг и МЕРО-TR в дозировке 50 мкг/кг. Объем повреждения мозга при применении МЕРО-TR в дозе 10 мкг/кг существенно не отличался от соответствующего показателя в контрольной группе.

Таким образом, при интраназальном введении МЕРО-Fc и МЕРО-TR после двустороннего фотохимического повреждения префронтальной коры крыс получены данные, свидетельствующие об антиамнестическом действии данных мутантных производных ЕРО, а МРТ анализ показал нейропротективный эффект МЕРО-TR в дозе 50 мкг/кг и ($p < 0,05$) и МЕРО-Fc как в стандартной, так и пятикратно уменьшенной дозе ($p < 0,05$).

Таблица

МРТ исследование суммарного объема очага ишемического повреждения по экспериментальным группам

Группы животных	0,9% раствор NaCl, 0,5 мл	МЕРО-TR, 50 мкг/кг	МЕРО-Fc, 50 мкг/кг	МЕРО-TR, 10 мкг/кг	МЕРО-Fc, 10 мкг/кг
Суммарный объем (мм ³) повреждения мозга на крысу при интраназальном введении	29,4	21,3*	19,5*	23,4	20,7*

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с группой с введением раствора NaCl 0,9% (Критерий Манна—Уитни)

Заключение

Оценка терапевтической эффективности мутантных белков (МЕРО-TR, МЕРО-Fc) проводилась по степени сохранения когнитивных функций, нарушенных при фотохимическом повреждении сосудов префронтальной коры головного мозга крыс и объема повреждения по данным МРТ исследования очага ишемического повреждения. Полученные данные показали статистически значимое сохранение выработанного до ишемии навыка и снижение объема повреждения, что указывает на ноотропную и нейропротективную активность мутантных белков. Результаты согласуются с данными других авторов, которые продемонстрировали, что при интраназальном введении, производные эритропоэтина эффективно преодолевают гематоэнцефалический барьер и обладают нейропротекторными свойствами даже при уменьшении дозы введения, что было показано на модели фокальной церебральной ишемии [15]. Наши результаты продемонстрировали, что мутантные формы эритропоэтина как в контексте мономера, так и в контексте димера (МЕРО-TR, МЕРО-Fc), являются перспективными кандидатами для коррекции ишемических повреждений головного мозга.

References

1. Romanova G.A., Silachev D.N., Shakova F.M., Viktorov I.V., Shram S.I., Myasoedov N.F. Neuroprotective and anti-amnesic effects of the peptide Semax with experimental brain ischemic infarct. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2006; 142 (12): 618-21. (In Russian)
2. Silachev D.N., Shram S.I., Shakova F.M., Romanova G.A., Myasoedov N.F. Long-term effects of synthetic analogue of ACTH (4-10) on the formation spatial memory in rats with ischemic damage prefrontal cortex. *Zhurnal Vyshey Nervnoy Deyatel'nosti im. I.P. Pavlova*. 2008; 45 (4): 458-66. (In Russian)
3. Gudasheva T.A., Romanova G.A., Shakova F.M., Barskov I.V., Stel'maschuk E.V. Neuroprotective and anti-amnesic effects of dipeptide mimetic growth factor of nerves — GK-2H with experimental ischemic brain infarction in rats. *Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya*. 2012; 10: 50-4. (In Russian)

4. Shakova F.M., Kalinina T.I., Barskov I.V., Romanova G.A. Comparison of the neuroprotective effects of erythropoietin derivatives with different modes of administration on the model bilateral focal lesions of the prefrontal cortex in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2015; 3: 26-33. (In Russian)
5. Kalinina T.I., Cheremnykh A.M., Jurin V.L., Romanova G.A., Shakova F.M. Neuroprotective effect of carbamylated erythropoietin and its derivatives. *Proceedings of the VIII Moscow International Congress «Biotechnology: state and development prospects»*. Moscow; 2015: Abstracts: 114-6. (In Russian)
6. Romanova G.A., Shakova F.M., Kalinina T.I., Jurin V.L. Correction of functional disorders with erythropoietin derivatives on the model of focal ischemia rat cerebral cortex. *Proceedings of the XI International interdisciplinary congress «Neuroscience for Medicine and Psychology»*. Sudak; 2015: Abstracts: 329. (In Russian)
7. Shakova F.M., Romanova G.A., Kalinina T.I. The neuroprotective effect of carbamylated erythropoietin derivatives on model bilateral photochemical thrombosis of prefrontal cortex in rats. *Proceedings of the European Behavioural Pharmacology Society Meeting*. Verona; 2015: Book of abstracts: 31.
8. Leist M., Ghezzi P., Grasso G., et al. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science*. 2004; 305: 239-41.
9. Buresh Y., Bureshova O.J., Houston A.P. *Methods and basic experiments on the brain and behavior*. Moscow: Higher School; 1999. (In Russian)
10. Paxinos G., Watson S. *Atlas of anatomy of rat brain. The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press; 1986.
11. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R. et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.* 1985; 17 (5): 497-504.
12. Silachev D.N., Uchevatkin A.A., Pirogov Y.A., Zorov D.B., Isaev N.K. Comparison of MRI detection of brain damage as the research methods of experimental focal ischemia. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2009; 147 (2): 223-6. (In Russian)
13. Romanova G.A., Barskov I.V., Viktorov I.V. Behavioral and morphological disorders caused by bilateral photochemical induced thrombosis of the frontal cortex in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 1998; 2: 8-10. (In Russian)
14. Privalova A.M., Gulyaeva N.V., Bukreeva T.V. Intranasal administration — a perspective way of delivery drugs in a brain. *Neyrokimiya*. 2012; 29 (2): 93-105. (In Russian)
15. Teste I.S., Tamos Y., Rodriguez Cruz Y. Dose effect evaluation and therapeutic window of the neuro-EPO nasal application for the treatment of the focal Ischemia model in the mongolian gerbil. *The Scientific World Journal*. 2012; Article ID 607.

Сведения об авторах:

Шакова Фатимат Мухамедовна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаборатории общей патологии нервной системы, shakova.fatima@yandex.ru

Романова Галина Александровна, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр. лаборатории общей патологии нервной системы, e-mail: romanovaga@mail.ru

Калинина Татьяна Игоревна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. иммунологии

Гуляев Михаил Викторович, научный сотр, канд. физ-мат. наук, факультета фундаментальной медицины МГУ;

Черемных Антон Михайлович, научный сотрудник лаборатории иммунологии

Юрин Виталий Львович, канд. мед. наук, заведующий лабораторией иммунологии

© Коллектив авторов, 2016
УДК 591.473.3:615.357:577.175.5

Труш В.В.¹, Соболев В.И.²

Влияние ятрогенного гиперкортицизма, индуцируемого длительным введением дексаметазона, на энергетику мышечного сокращения у белых крыс

¹ — ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет», 83050, г.Донецк, ул. Щорса, д. 46

² — ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», 298635, Республика Крым, Россия, г. Ялта, ул. Стахановская, д. 11

Цель исследования — выявление характера изменений миотермических и эргометрических показателей сокращения передней большеберцовой мышцы крыс при выполнении утомляющей работы в процессе насыщения организма терапевтическими дозами дексаметазона. **Методика.** Эксперименты выполнены на половозрелых крысах-самках (200—220 г), разделенных на контрольную (n = 10) и опытную (n = 60) группы. Животным опытной группы через день внутривенно вводили дексаметазон (Д, KRKA, Словения) в дозе 0,25 мг/кг (через день) на протяжении от 10 до 60 сут. На наркотизированных животных (тиопентал натрия, 100 мг/кг) в условиях *in situ* методами миотермии и эргографии изучали энергетику сокращения мышцы в процессе выполнения утомляющей работы (три 6-секундных тетануса с внешней нагрузкой 80 г). **Результаты.** На начальном этапе развития ятрогенного гиперкортицизма (5—20 инъекций Д) исходное значение внешней работы мышцы, в сравнении с контролем, было существенно ниже (на 30—52%), а температурная стоимость единицы мышечной работы (ТСМР), напротив, — выше (на 26—82%). По завершении 2-месячного периода введения Д исходные значения энергетических параметров мышцы возвращались к уровню контроля. В процессе выполнения утомляющих тетанусов у животных опытных групп снижение внешней работы мышцы было более выраженным (69—73%) по сравнению с контролем (55%); данный эффект не зависел от числа инъекций Д, что свидетельствует о высокой эффективности глюкокортикоида в отношении работоспособности мышцы. При выраженном утомлении мышцы ТСМР всегда возрастала по сравнению с исходной величиной от 104% (5 инъекций Д) до 230% (20 инъекций); у контрольных животных влияние утомляющей работы на ТСМР был существенно слабее (28%). При длительном введении Д (2 мес.) эффект препарата ослаблялся, хотя и оставался четко выраженным. **Заключение.** Полученные данные рассматриваются с точки зрения формирования при гиперкортицизме патофизиологического механизма — повышения энергетической стоимости мышечной работы. Выявленный эффект Д может лежать в основе формирования при гиперкортицизме ряда механизмов в нервно-мышечной системе, в том числе обуславливающих развитие миопатии.

Ключевые слова: скелетная мышца; дексаметазон; гиперкортицизм, энергетика мышечного сокращения.

Для корреспонденции: Труш Вера Владимировна, канд. мед. наук, доцент, и.о. зав. каф. физиологии человека и животных «Донецкого национального университета», г.Донецк, e-mail: ver.trush@yandex.ru

Для цитирования: Труш В.В., Соболев В.И. Влияние ятрогенного гиперкортицизма, индуцируемого длительным введением дексаметазона, на энергетику мышечного сокращения у белых крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 39—46.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.08.2015

Trush V.V.¹, Sobolev V.I.²

Influence of iatrogenic hypercorticism induced by long-term application of dexamethasone on power of muscular contraction of white rats

¹ — SEI HE «Donetsk national university», the department of physiology of human and animals, 83050, Donetsk, Shchorska St., 46

² — FSAEI HE V.I. Vernadsky Crimean Federal University, the department of health and rehabilitation, Republic of Crimea, Yalta, Stahanovskaya St., 11, Russia

Research objective consisted in detection of nature of the changes of the myothermic and the ergometric parameters of the contraction of the forward tibial muscle of rats in the course of performing of the tiring work at the saturation of an organism by therapeutic doses of dexamethasone. **Method.** The experiments were performed on sexually mature rats-females (200—220 g), divided into control (n = 10) and experimental (n = 60) groups. The animals of experimental group received

dexamethasone (**D**, KRKA, Slovenia) in a dose of 0,25 mg/kg (intraperitoneal, 1 time in 2 days) during from 10 to 60 days. On anesthetized animals (sodium thiopental, 100 mg/kg) with the use of myothermia and ergographia the nature of change of power of the muscle's contraction in the course of the performance of the tiring work (3 six-second tetanus with external loading of 80 g) was studied. **Results.** At the initial stage of the development of iatrogenic hypercorticism (after 5—20 injections of **D**) the initial value of the external work of the muscle in comparison with the control is significantly lower (for 30—52%) and the temperature cost of the unit of the work (TCMW), on the contrary, — is higher (for 26—82%). On the end of the 2-month period of application of **D** the initial values of the power parameters of the muscle came back to control level. During the performance of the tiring tetanus in animal experimental groups the decline of the external work of the muscle is greater (69—73%) compared with the control (55%). This effect does not depend of the number of injections of **D**, which indicates about a high pathophysiological activity of glucocorticoid concerning working capacity of the muscle. At expressed fatigue the TCMW always increases from 104% (5 injections of **D**) to 230% (20 injections); at control animals the effect of the tiring work on TCMW is significantly weaker (28%). At long-term application of **D** (2 months) the described effect of the preparation is weakened, though remains accurately expressed. **Conclusion.** The obtained data are considered from the point of view of formation at the hypercorticism of the pathophysiological mechanism — the increase of power cost of muscular work. The revealed effect of **D** can be the cornerstone of the formation of the number of the pathophysiological mechanisms in neuromuscular system including causing the development of the myopathy at the hypercorticism.

Keywords: skeletal muscle; dexamethasone; power of muscular contraction.

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

For citation: Trush V.V., Sobolev V.I. Influence of iatrogenic hypercorticism induced by long-term application of dexamethasone on power of muscular contraction of white rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (4): 39—46 (in Russ).

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

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

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

Received 11.08.2015

Введение

Глюкокортикоиды и их синтетические аналоги широко используются в клинической практике в связи с выраженным противовоспалительным, антиаллергическим и иммуносупрессорным эффектом [1]. Наряду с позитивными для лечения воспалительных заболеваний эффектами, данные препараты оказывают негативное побочное действие на нервно-мышечную, костную и лимфоидную системы [2]. Наиболее выраженным отрицательным эффектом характеризуются высоко активные синтетические фторсодержащие аналоги глюкокортикоидов пролонгированного действия, в частности, дексаметазон [2], которые нередко используют для иммуносупрессии и терапии тяжелых воспалительных и аллергических заболеваний. Длительное применение подобных препаратов может сопровождаться развитием симптомов ятрогенного гиперкортицизма, обуславливающего миопатические изменения в скелетных мышцах больных в связи с выраженным катаболическим действием на мышечную ткань избыточных концентраций глюкокортикоидов [3, 4]. Наиболее выраженные миопатические измене-

ния при гиперкортицизме любой этиологии развиваются в скелетных мышцах с преобладанием волокон быстрого типа [5].

Несмотря на наличие в литературе большого экспериментального материала относительно морфофункциональных нарушений в скелетной мускулатуре, вызванных избытком глюкокортикоидов [5—10], особенности энергетики мышцы, отражающие ее метаболические и функциональные расстройства, особенно в динамике развития гиперкортикоидного состояния, изучены недостаточно. В качестве рабочей гипотезы предполагалось, что одним из проявлений миопатии при гиперкортицизме может служить изменение энергетической стоимости (цены) мышечного сокращения, обусловленное определенными патофизиологическими механизмами действия глюкокортикоидов в скелетной мышце.

Целью работы было выявление *in situ* характера изменений миотермических и эргометрических показателей сокращения передней большеберцовой мышцы крыс при выполнении утомляющей работы в процессе насыщения организма терапевтическими дозами дексаметазона.

Методика

Исследования выполнены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального института здоровья № 85-23, США) и «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [11]. Объектом исследования служила передняя большеберцовая мышца, относящаяся, как и большинство мышц млекопитающих, к смешанному типу с преобладанием быстрых мышечных волокон [12], характеризующихся более высокой чувствительностью к глюкокортикоидам, по сравнению с медленными волокнами [5].

Эксперименты проводились на 70 половозрелых крысах-самках с массой 220 ± 2 г в возрасте 4—5 мес. Крысы были разделены на 2 группы: контрольная ($n = 10$) и опытная ($n = 60$). Животным опытной группы вводили синтетический аналог глюкокортикоидов — дексаметазон (раствор для инъекций фирмы KRKA, Словения). Препарат вводили внутривенно через день на протяжении 10—60 сут. в дозе, сопоставимой с терапевтической для человека (0,25 мг/кг). Таким образом, в пределах опытной группы было сформировано 6 подгрупп животных (по 10 крыс), каждая из которых получала разное количество инъекций дексаметазона: 5, 10, 15, 20, 25 и 30 (5Д, 10Д-группа и т.д.).

Для регистрации исследуемых показателей мышечного сокращения использовалась экспериментальная установка, состоящая из трех каналов. Канал электростимулятора представлен собственно электростимулятором, построенным на основе функционального генератора ICL8038CCDP, оптронной гальванической развязкой и биполярными игольчатыми стальными электродами с межэлектродным расстоянием 1 мм. Эргометрический канал включал датчик перемещения (потенциометрический датчик ПТП-1) и регистрирующее устройство. Описанный канал служил для измерения высоты, на которую поднимается груз во время сокращения мышцы с грузом, а также графической записи в цифровом виде собственно миограммы (эргограммы) в память многоканального цифрового запоминающего осциллографа Tektronix (TDS2004C). Термометрический канал был представлен медь-константановой термопарой, фотокомпенсационным усилителем Ф-116 и регистратором (цифровой запоминающий осциллограф TDS2004C). Термопара выполнялась из тонкой проволоки диаметром 50 мкм и в ходе проведения опыта прошивалась через исследуемую переднюю большеберцовую мышцу. Разрешающая способность термометрического канала устанавливалась на уровне $0,01^\circ\text{C}$.

Перед проведением острого опыта животное наркотизировали (тиопентал натрия, 100 мг/кг, внутривенно), после чего препарировали в области бедра малоберцовый нерв и на расстоянии 1 см проксимальнее коленного сустава подводили под него раздражающие электроды. Названный нерв иннервирует переднюю большеберцовую мышцу, сокращение которой вызывает сгибание стопы задней лапки. Стопа задней лапки животного крепилась зажимом, после чего на уровне большого пальца затягивалась лигатура, соединенная с потенциометрическим датчиком (датчик перемещения). При раздражении малоберцового нерва (6 с сверхпороговыми электрическими импульсами частотой 60 имп./с при длительности импульсов 0,5 мс и силе тока 1000 мкА) стопа изгибалась, поднимая груз массой 80 граммов. Выбранная длительность нанесения раздражения (6 с) была достаточна для максимального укорочения мышцы в режиме гладкого тетануса. Зная высоту, на которую поднимался груз, в дальнейшем можно было рассчитать выполненную мышцей внешнюю работу (A , мДж). Одновременно с миограммой (эргограммой) регистрировалась термограмма, на основании которой измерялась величина прироста температуры мышцы при ее сокращении (температурный эффект мышечного сокращения — ΔT°). Это позволяло в дальнейшем рассчитать отношение прироста температуры мышцы при ее сокращении к величине выполненной работы ($\Delta T^\circ/\text{мДж}$). Расчетный показатель получил название «температурной стоимости мышечной работы — TCMР» [13], отражающей энергетическую «цену» единицы (1 мДж) выполненной мышцей внешней работы.

В ходе опыта исследуемые показатели мышечного сокращения регистрировали 4 раза по следующему алгоритму: 1-й тетанус (период «До работы», исходные значения), 2-й тетанус (после предварительных трех 6-секундных тетанических сокращений с грузом 80 г), 3-й тетанус (после следующих трех 6-секундных сокращений) и 4-й тетанус (после заключительных трех 6-секундных сокращений — период «После работы»).

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

Для оценки статистической значимости различий между центральными тенденциями сравниваемых групп (контрольной и опытных, получивших разное количество инъекций дексаметазона) использовали t -критерий Стьюдента, предварительно убедившись в том, что распределение значений исследуемых показателей в вариационном ряду соответствует нормальному закону (W -тест Шапиро—Уилка). Для оценки характера зависимости между числом инъекций дек-

саметазона и величиной исследуемых показателей использовался регрессионный анализ. Уровень p меньше 0,05 рассматривали как статистически значимый.

Результаты и обсуждение

На первом этапе анализа полученных данных представляют интерес результаты измерения параметров мышечного сокращения в период «До работы» (1-й тетанус) в зависимости от числа инъекций дексаметазона. Хроническое введение дексаметазона существенно отражалось на параметрах энергетики сокращения передней большеберцовой мышцы, характер изменения которых во многом зависел от длительности введения препарата. Так, после 5—25 инъекций дексаметазона объем внешней работы, выполненной мышцей животных опытных групп (период «До работы», табл. 1), снижался относительно контроля на 30—42%. Масса мышцы уменьшалась на 13—18%. По окончании двухмесячного периода введения синтетического глюкокортикоида (группа 30Д) объем внешней работы, выполненной мышцей, нормализовался (табл. 1), несмотря на сохраняющееся уменьшение ее массы (11%).

На фоне сниженной после 5—25 инъекций дексаметазона внешней работы мышцы прирост ее температуры после 1-го тетанического сокращения снижался только после 25 инъекций препарата (на 40% относительно контроля, см. табл. 2). В связи с этим температурная стоимость мышечной работы (ТСМР), численно равная отношению прироста температуры мышцы к объему выполненной работы, спустя 5—20 инъекций дексаметазона существенно превышала уровень контроля, соответственно на 26—82% (табл. 3).

В дальнейшем, вместе с увеличением числа инъекций препарата до 25, наблюдалось снижение (относительно контрольной группы) прироста температуры мышцы после ее сокращения (на 41%), что на фоне уменьшения объема внешней работы (на 41%) обусловило отсутствие статистически значимых изменений со стороны расчетного показателя ТСМР.

Таким образом, на первом этапе развития ятрогенного гиперкортицизма (5—20 инъекций дексаметазона) у животных всех опытных групп, во-первых, наблюдалось снижение объема работы, выполненной скелетной мышцей при тетаническом сокращении, и, во-вторых, отмечено повышение температурной стоимости единицы (1 мДж) мышечной работы.

По окончании двухмесячного периода введения препарата (30 инъекций, группа 30Д) энергетические параметры мышцы — объем выполняемой внешней работы, прирост температуры после сокращения и ТСМР — возвращались к контрольному уровню (табл. 1—3), а масса мышцы, хотя и оставалась сниженной (на 11%), но проявляла тенденцию к нормализации.

С целью более детального изучения нарушений энергетики мышечного сокращения в динамике развития гиперкортикоидного состояния на следующем этапе был исследован эффект утомляющей работы, которая может служить своеобразным тестом на наличие скрытых патологических изменений в нервно-мышечном аппарате.

При анализе полученных данных обращают на себя внимание следующие основные моменты. Во-первых, по мере развития утомления объем работы, выполненной мышцей, закономерно уменьшается у животных всех групп. По данным табл. 1 видно, что у крыс контрольной группы объем работы неуклонно

Значения объема внешней работы, выполненной мышцей при сокращении ($X \pm m$, мДж), в ходе развития экспериментального гиперкортицизма

Таблица 1

Условия опыта	Группа животных						
	Контрольная	5Д	10Д	15Д	20Д	25Д	30Д
До работы: 1-й тетанус	11,8 ± 0,64	8,3 ± 1,01 (30%)*	6,5 ± 0,68 (45%)*	6,3 ± 0,84 (47%)*	5,6 ± 0,60 (52%)*	6,9 ± 0,81 (-41%)*	11,1 ± 0,91 (6%)
В ходе работы: 2-й тетанус	8,2 ± 0,51 30% [@]	4,3 ± 0,61 49% [@] (48%)*	3,9 ± 0,41 40% [@] (53%)*	4,0 ± 0,49 36% [@] (51%)*	2,9 ± 0,37 65% [@] (65%)*	4,7 ± 0,53 33% [@] (43%)*	7,6 ± 0,79 32% [@] (6%)
В ходе работы: 3-й тетанус	6,2 ± 0,30 47% [@]	2,5 ± 0,38 69% [@] (59%)*	3,3 ± 0,39 49% [@] (46%)*	3,1 ± 0,43 51% [@] (50%)*	2,5 ± 0,27 55% [@] (60%)*	3,0 ± 0,34 57% [@] (52%)*	4,7 ± 0,56 57% [@] (24%)*
После работы: 4-й тетанус	5,2 ± 0,25 56% [@]	2,6 ± 0,38 69% [@] (50%)*	1,9 ± 0,24 71% [@] (64%)*	1,9 ± 0,28 70% [@] (64%)*	1,2 ± 0,15 79% [@] (77%)*	2,0 ± 0,25 71% [@] (61%)*	3,0 ± 0,36 73% [@] (42%)*

Примечание. [@] — разница показателя относительно периода «До работы» соответствующей группы и ее статистическая значимость ($p < 0,05$); * — в круглых скобках указана разница относительно уровня контрольной группы и ее статистическая значимость ($p < 0,05$).

снижался — от 30% в первом периоде опыта (2-й тетанус) до 56% в завершающем периоде (4-й тетанус). Параллельно с падением работоспособности мышцы наблюдалось статистически значимое снижение прироста ее температуры при сокращении (табл. 2).

Аналогичный характер изменений работы мышцы отмечался и у животных опытных групп (табл. 1). Однако степень снижения была существенно выше в сравнении с контрольной группой. Например, у крыс 10Д- и 30Д-групп к окончанию периода утомляющей работы (4-й тетанус) данный показатель уменьшился в сравнении с исходной величиной соответственно на 71% и 73%.

Что касается динамики прироста температуры мышцы при ее сокращении, то характер изменений

данного показателя в процессе выполнения утомляющей работы у животных всех опытных групп качественно не различался, в целом уменьшаясь к 4-му тетанусу на 30—38% (табл. 2).

Выявлена общая закономерность со стороны характера зависимости между объемом работы мышцы и числом инъекций дексаметазона (рисунок, табл. 1). Такая зависимость для всех групп животных хорошо описывается уравнением параболы при высокой степени значимости аппроксимации кривой. Статистический анализ показал высокое значение показателя детерминации (до $R^2 = 0,94$) и коэффициентов регрессии в уравнениях ($R = 0,71—0,97$) при высокой статистической значимости ($p = 0,0019—0,0047$). Величины всех коэффициентов в уравнениях статисти-

Таблица 2

Значения прироста температуры мышцы после сокращения ($X \pm m$, °C) при развитии экспериментального гиперкортицизма

Условия опыта	Группы животных						
	Контрольная	5Д	10Д	15Д	20Д	25Д	30Д
До работы: 1-й тетанус	0,25 ± 0,01	0,21 ± 0,02 (15%)	0,31 ± 0,03 (+25%)	0,27 ± 0,02 (+10%)	0,21 ± 0,02 (13%)	0,15 ± 0,02 (41%)*	0,24 ± 0,02 (1%)
В ходе работы: 2-й тетанус	0,18 ± 0,01 29% [@]	0,18 ± 0,02 16% (0%)	0,27 ± 0,03 12% (+54%)*	0,25 ± 0,03 8% (+43%)*	0,20 ± 0,02 7% (+14%)	0,14 ± 0,02 4% (20%)	0,22 ± 0,02 9% (+26%)
В ходе работы: 3-й тетанус	0,16 ± 0,01 35% [@]	0,14 ± 0,01 33% [@] (13%)	0,24 ± 0,03 22% (+49%)*	0,21 ± 0,02 22% (+30%)	0,18 ± 0,02 16% (+12%)	0,13 ± 0,01 11% (-19%)	0,20 ± 0,02 18% (+24%)
После работы: 4-й тетанус	0,14 ± 0,01 43% [@]	0,14 ± 0,01 33% [@] (0%)	0,19 ± 0,02 38% [@] (+35%)	0,17 ± 0,02 37% [@] (+21%)	0,15 ± 0,02 30% [@] (+7%)	0,11 ± 0,01 25% (-22%)	0,17 ± 0,02 30% [@] (+21%)

Примечание. [@] — разница показателя относительно периода «До работы» соответствующей группы и ее статистическая значимость ($p < 0,05$); * — в круглых скобках указана разница относительно уровня контрольной группы и ее статистическая значимость ($p < 0,05$).

Таблица 3

Значения показателя температурной стоимости мышечной работы (ТСМР, $X \pm m$ (°C/мДж)10⁻³) при развитии экспериментального гиперкортицизма

Условия опыта	Группы животных						
	Контрольная	5Д	10Д	15Д	20Д	25Д	30Д
До работы: 1-й тетанус	20,7 ± 1,3	26,4 ± 2,1 (+26%)*	47,4 ± 5,1 (+127%)*	43,1 ± 3,8 (+106%)*	38,1 ± 4,1 (+82%)*	21,1 ± 2,4 (+1%)	21,8 ± 2,3 (+4%)
В ходе работы: 2-й тетанус	21,2 ± 1,5 +2%	41,5 ± 4,0 +57% [@] (+95%)*	69,4 ± 7,5 +46% [@] (+227%)*	62,4 ± 6,9 +45% [@] (+194%)*	68,5 ± 7,1 +80% [@] (+223%)*	30,0 ± 3,3 +42% [@] (+41%)*	28,9 ± 2,9 +32% [@] (+36%)*
В ходе работы: 3-й тетанус	26,0 ± 2,1 +24%	54,9 ± 5,6 +108% [@] (+111%)*	72,1 ± 7,9 +52% [@] (+177%)*	67,6 ± 7,1 +57% [@] (+160%)*	71,8 ± 7,3 +88% [@] (+176%)*	43,7 ± 4,6 +107% [@] (+68%)*	42,3 ± 4,5 +94% [@] (+63%)*
После работы: 4-й тетанус	26,8 ± 2,1 +28% [@]	53,9 ± 5,6 +104% [@] (+101%)*	101,8 ± 11,0 +115% [@] (+280%)*	91,0 ± 9,9 +111% [@] (+240%)*	125,8 ± 13,1 +230% [@] (+370%)*	54,1 ± 7,0 +156% [@] (+102%)*	55,8 ± 6,0 +156% [@] (+108%)*

Примечание. [@] — разница показателя относительно периода «До работы» соответствующей группы и ее статистическая значимость ($p < 0,05$); * — в круглых скобках указана разница относительно уровня контрольной группы и ее статистическая значимость ($p < 0,05$).

чески значимы ($0,038 > p > 0,00073$). Собственно уравнения имели следующий вид:

$A = 16,5 + 0,63D - 5,25D^2$ — 1-е тестовое сокращение (начало работы);

$A = 11,4 + 0,51D - 4,12D^2$ — 2-е тестовое сокращение (первый период);

$A = 7,75 + 0,29D - 2,51D^2$ — 3-е тестовое сокращение (второй период);

$A = 7,20 + 0,29D - 2,59D^2$ — 4-е тестовое сокращение (конец работы),

где:

A — объем (мДж) выполненной работы при тестовом сокращении (тетанусе);

D — число инъекций дексаметазона.

Характер расположения кривых для животных разных групп позволяет выделить, по крайней мере, 2 особенности. Во-первых, в ходе развития утомления работоспособность мышцы у животных всех групп, независимо от числа инъекций дексаметазона, снижалась. На это указывает закономерное смещение кривых относительно первого сокращения по шкале ординат вниз. Наиболее выраженный отрицательный эффект препарата отмечался у животных 20Д-группы, о чем свидетельствует наибольший прогиб кривой «доза дексаметазона — объем работы» в точке «20Д».

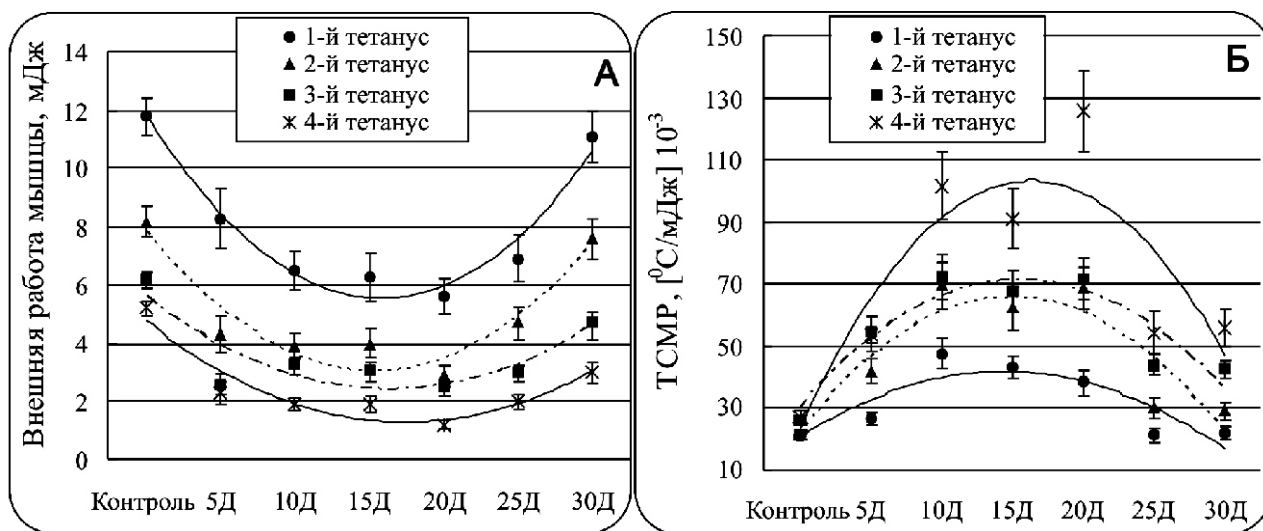
Во-вторых, при нарастании числа инъекций дексаметазона его отрицательный эффект ослабевает. Так, у крыс 30Д-группы (препарат вводился на протяжении 60 сут.) способность мышцы к выполнению внешней работы частично восстанавливалась, о чем свидетельствует статистически значимое «возвращение» объема мышечной работы к уровню контрольных животных, в частности при первом и втором тес-

товом сокращении (рисунок, табл. 1). Аналогичная тенденция, хотя и менее выраженная, проявлялась и у животных 25Д-группы.

Особенности действия дексаметазона на работоспособность скелетной мышцы, по-видимому, определяются его способностью модулировать фундаментальные свойства энергетики сократительного акта. Как мы полагаем, такой точкой действия глюкокортикоида может выступать «энергетическая цена» работы, выполняемой мышцей при сокращении. Критерием такой «цены» служит температурная стоимость мышечной работы (ТСМР). Эмпирические данные, полученные при измерении объема работы мышцы и прироста ее температуры, позволили рассчитать такого рода коэффициент (табл. 3, рисунок). Как следует из представленных данных, у животных контрольной группы в процессе развития утомления значение коэффициента ТСМР прогрессивно увеличивалось с $20,7 \pm 1,2$ в начале работы до $26,8 \pm 2,1 [(\text{°C}/\text{мДж})10^3]$ в конце работы, т.е. возрастало на 28%.

Аналогичные результаты получены у животных опытных групп. Однако эффект утомляющей работы на температурную стоимость работы был несравненно выше. Например, у крыс 5Д- и 30Д-групп при развитии утомления ТСМР в конце периода работы возрастала соответственно на 104% и 156% по сравнению с периодом «До работы». Наибольший эффект на ТСМР утомляющая работа оказывала у животных 20Д-группы (230%), что было в 8 раз больше, чем у крыс контрольной группы (соответственно 230% и 28%).

Характер зависимости «Число инъекций дексаметазона — ТСМР» описывается уравнением параболы



Характер зависимости некоторых параметров мышечного сокращения при выполнении утомляющей работы от числа инъекций дексаметазона. А — объем выполненной внешней работы, мДж; Б — температурная стоимость мышечной работы, ТСМР [(°C/мДж) 10³].

лы второго порядка (рисунок), вершина которой при усугублении степени выраженности экспериментального гиперкортицизма смещается по шкале абсцисс от точки «10Д-группа» к точке «20Д-группа». Кривые характеризуются достаточно высокими регрессионными коэффициентами (0,72—0,84 при $0,049 > p > 0,023$) и имеют следующий вид:

$TСМР = 2,94 + 19,9Д - 2,56Д^2$ — 1-е тестовое сокращение (начало работы);

$TСМР = 12,1 + 37,9Д - 4,71Д^2$ — 2-е тестовое сокращение (первый период);

$TСМР = 1,20 + 35,2Д - 4,29Д^2$ — 3-е тестовое сокращение (второй период);

$TСМР = 33,7 + 64,3Д - 7,54Д^2$ — 4-е тестовое сокращение (конец работы),

где:

$TСМР$ — значение температурной стоимости мышечной работы, [$^{\circ}C/мДж \cdot 10^{-3}$];

$Д$ — число инъекций дексаметазона.

Характерной особенностью всех зависимостей является первоначальный рост температурной стоимости мышечной работы, сменяющийся тенденцией к постепенной нормализации данного показателя энергетики сократительного акта (т.е. «возвращению» к уровню контроля). На это указывает характер расположения левой и правой ветвей параболической зависимости «Число инъекций дексаметазона — $TСМР$ ». Данный факт свидетельствует об активации компенсаторных механизмов адаптации в нервно-мышечной системе при длительном (2 месяца) введении дексаметазона.

Эффект нормализации в наибольшей степени проявился у крыс 25Д- и 30Д-групп. Например, если при первом сокращении мышцы (1-й тетанус) изменение $TСМР$ у крыс 5Д-20Д-групп было на 26—82% больше уровня контрольных животных (табл. 3), то в группах 25Д и 30Д показатель температурной стоимости работы уже существенно не отличался от уровня контроля (1% и 4%). В конце периода выполнения утомляющей работы (4-й тетанус) коэффициент $TСМР$ у животных 10Д-группы был на 280% выше контроля (в 3,8 раза), а у крыс 25Д- и 30Д-группы уже существенно ниже, соответственно, на 102% и 108%, т.е. в 2,0 и 2,1 раза. Это позволяет говорить, что при достаточно длительном введении дексаметазона его эффект на температурную стоимость мышечной работы ослабляется при выраженной тенденции к нормализации.

Обсуждая полученные данные, необходимо выделить следующие основные моменты. Во-первых, при использованной модели формирования экспериментального гиперкортицизма отмечается существенное ослабление в условиях *in situ* эрготропной функции скелетной мышцы. Данный эффект дексаметазона, с нашей точки зрения, может быть связан с частичной

дистрофией мышечных волокон, особенно гликолитического типа, проявляющих более высокую чувствительность к глюкокортикоидам [5]. В пользу возможных дистрофических изменений передней большеберцовой мышцы крыс, получавших дексаметазон, свидетельствует наблюдаемое нами уменьшение ее массы (на 13%) уже после 5 инъекций препарата. Однако данный механизм ослабления способности мышцы к выполнению внешней работы, по-видимому, не является основным, поскольку после двухмесячного периода введения глюкокортикоида объем работы мышцы при первом тестовом тетаническом сокращении (период «До работы», табл. 1) не отличался от уровня контрольных животных, хотя масса мышцы оставалась сниженной на 11%.

Во-вторых, ослабление эрготропной функции скелетной мышцы при экспериментальном гиперкортицизме может быть связано, с каким-либо фундаментальным механизмом сократительного акта. Таким механизмом может быть снижение энергетической стоимости (цены) механической работы мышцы. В таком случае следует ожидать, что при выполнении стандартной единицы внешней работы мышца будет тратить большее количество энергии, что равносильно снижению коэффициента полезного действия. Именно такое предположение согласуется с результатами нашей работы: при экспериментальном гиперкортицизме температурная стоимость единицы выполненной мышцей внешней работы (показатель $TСМР$), в том числе при выполнении утомляющей работы, всегда превышала уровень контроля. Выявленный факт может быть связан с понижением эффективности биологического окисления в мышечных волокнах, в частности за счет активации так называемых «механизмов диссипации энергии» [13]. Принципиальная возможность существования такого рода механизмов в скелетной мышце в условиях *in vitro* и *in situ* была показана ранее [13].

Наконец, в-третьих, результаты нашей работы указывают на возможность развития процесса определенной адаптации нервно-мышечной системы к длительному введению фиксированных доз синтетического глюкокортикоида. В частности, это относится к животным 30Д-группы, получавших дексаметазон в течение 60 сут. Так, к этому периоду отмечена нормализация показателей объема работы мышцы и $TСМР$. Однако такой эффект проявляется лишь в период «До работы» и исчезает при выполнении утомляющих тетанусов. Нормализация энергетических параметров сокращения мышцы и положительная динамика ее массы по окончании двухмесячного периода введения дексаметазона свидетельствует об уменьшении к этому сроку деструктивных процессов в нервно-мышечной системе. Такого рода предположение согласуется с результатами

исследований некоторых авторов [7, 8], указывающих на постепенное снижение активности миофибриллярных и других мышечных протеаз и соответственно ослабление протеолиза мышечных белков при длительном хроническом введении глюкокортикоидов в организм. Кроме того, в более ранних наших работах [9, 10] при исследовании электрофизиологических, скоростных и силовых параметров передней большеберцовой мышцы в динамике введения дексаметазона был отмечен факт фазного их изменения (первоначального ухудшения с последующей тенденцией к нормализации по окончании двухмесячного периода введения препарата).

Таким образом, представленные в работе данные могут рассматриваться с точки зрения формирования при экспериментальном гиперкортицизме патофизиологического механизма — повышения энергетической стоимости мышечной работы. Выявленный эффект дексаметазона может лежать в основе формирования при гиперкортицизме ряда патофизиологических механизмов в нервно-мышечной системе, в том числе обуславливающих развитие миопатии.

References

1. Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Moore P.K., ed. *Pharmacology*. 5th ed. London: Churchill Livingstone; 2003.
2. Borisova E.O. Clinical pharmacology of parenteral forms of glucocorticoids. *Lechebnoye delo*. 2007; 3: 17-24. (In Russian)
3. Gardner D., Shoback D. *Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology*. 9th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2011.
4. Polunina A.G., Isaev F.V., Dem'ianova M.A. Steroid-induced myopathy. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2012; 112 (10-2): 60-4. (In Russian)
5. Savary I., Debras E., Dardevet D. Effect of glucocorticoid excess on skeletal muscle and heart protein synthesis in adult and old rats. *British Journal of Nutrition*. 1998; 3: 297-304.
6. Sobolev V.I., Trush V.V., Litvyak K.A., Morozova I.N. Frequency Dependence of Parameters of the M-Response of the Rat M. Tibialis in the Norm and in Experimental Hyperthyroidism and Hypercorticism. *Neurophysiology*. 2015; 47(1): 53-60.
7. Kazaryan V.A., Shchelkunov A.V., Rapoport E.A. Action of hydrocortisone on a protein metabolism in skeletal muscles. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im S.S. Korsakova*. 1983; 11: 1654-9. (In Russian)
8. Bowes S.B., Jackson N.C., Papachristodoulou D. Effect of corticosterone on protein degradation in isolated rat soleus and extensor digitorum longus muscles. *J. Endocrinol*. 1996; 3: 501-7.
9. Trush V.V., Sobolev V.I. Modulation of Dexamethasone-Induced Effects on the Rat Skeletal Muscles by Testosterone. *International Journal of Physiology and Pathophysiology*. 2013; 4(4): 209-40.
10. Sobolev V.I., Trush V.V. Influence of Thyroxine on Display of Dexamethasone's Effects on M-response's Parameters of Skeletal Muscle of White Rats. *Ros Fiziol Zhurnal (im I.M. Sechenov Physiological Journal)*. 2013. 99 (9): 1067-76. (In Russian)
11. Fisenko V.P., eds. Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. [*Rukovodstvo po eksperimentalnomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv*] M.: Minzdrav RF, ZAO «IIA «Remedium»; 2000. (In Russian)
12. Gauthier G.F. Skeletal muscle fiber types. In: Engel A.G., Banker B.Q., eds. *Myology. Basic and clinical*. New York, NY: McGraw-Hill; 1986: 255-283.
13. Sultanov F.F., Sobolev V.I. *Hormonal mechanisms of temperature adaptation. [Gormonal'nye mekhanizmy temperaturnoy adaptatsii.]* Ashkhabad: Ylym; 1991. (In Russian)

Сведения об авторах:

Соболев Валерий Иванович, доктор биол. наук, проф., каф. здоровья и реабилитации «Института педагогики, психологии и инклюзивного образования Гуманитарно-педагогической академии Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского» (г.Ялта), Россия, e-mail: v.sobolev@mail.ru

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616-092

Кузник Б.И.^{1,2}, Давыдов С.О.^{1,2}, Степанов А.В.^{1,2}, Морарь Н.В.²

Влияние кинезитерапевтических процедур на содержание ирисина у женщин с заболеваниями сердечно-сосудистой системы в зависимости от массы тела и гормонального статуса

¹ — ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия», Чита, Россия, 672090, г.Чита, Горького, д. 39-а

² — Иновационная клиника «Академия здоровья», 672038, г.Чита, ул. Коханского, д. 13

Наблюдения проведены на 41 женщине от 32 до 69 лет с компенсированными заболеваниями сердечно-сосудистой системы. У 23 из них был повышен индекс массы тела (ИМТ). Установлено, что чем женщины старше, тем меньше в крови содержится мышечного гормона ирисина. У людей с повышенным ИМТ концентрация в крови ирисина увеличена. Обнаружены прямые корреляционные связи между содержанием ирисина и уровнем женских половых гормонов — эстрогена и прогестерона. Под воздействием кинезитерапевтических процедур содержание ирисина у женщин с нормальным ИМТ возрастает, а при повышенном — в большинстве случаев остается стабильным или снижается. Характер ответной реакции со стороны ирисина на кинезитерапевтические процедуры зависит от его исходного уровня, интенсивности физической нагрузки и степени тренированности.

Ключевые слова: ирисин; возраст; индекс массы тела (ИМТ); сердечно-сосудистая система; эстроген; прогестерон; физическая нагрузка.

Для цитирования: Кузник Б.И., Давыдов С.О., Степанов А.В., Морарь Н.В. Влияние кинезитерапевтических процедур на содержание ирисина у женщин с заболеваниями сердечно-сосудистой системы в зависимости от массы тела и гормонального статуса. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 47—51.

Для корреспонденции: Кузник Борис Ильич, проф. каф. нормальной физиологии ЧГМА, научный консультант иновационной клиники «Академия здоровья», доктор мед. наук, засл. деятель науки РФ, e-mail: bi_kuznik@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.05.2016

Kuznik B.I.^{1,2}, Davydov S.O.^{1,2}, Stepanov A.V.^{1,2}, Morar N.V.²

The Effect of Kinesitherapy Exercises on the Level of Irisin among Females with Cardio-vascular diseases depending on the body mass and hormonal status

¹ — Chita State Medical Academy, Gorky str. 39 A, Chita, Russia, 672090

² — «Health Academy» Innovative Clinic, Kokhansky str. 13, Chita, Russia, 672038

The observation was conducted on 41 female subjects age 32 to 69 with compensated cardio-vascular diseases. 23 of the subjects had an increased body mass index (BMI). It was established that the older the females the less of the irisin muscle hormone is found in the blood. In the subjects with a higher BMI the level of irisin in the blood is also higher. Direct correlations were found between the level of irisin and the level of female sex hormones — estrogen and progesterone. Under the effect of kinesitherapy exercises the level of irisin in females with normal BMI increases; whereas in the females with a higher BMI it generally stays the same or is decreased. The characteristics of irisin's response to the kinesitherapy exercises depends on its original level, the intensity of physical exercise and the subject's physique.

Keywords: irisin; age; body mass index (BMI); estrogen; progesterone; physical exercise.

For citation: B. Kuznik, S. Davydov, A. Stepanov, N. Morar The Effect of Kinesitherapy Exercises on the Level of Irisin among Females with Cardio-vascular diseases depending on the body mass and hormonal status. *Exsperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2016; 60 (4): 47—51. (in Russ).

For correspondence: Kuznik Boris Ilitch, Doctor of Medical Sciences, Professor of Normal Physiology Department of Chita State Medical Academy (Gorky str. 39 A, Chita, Russia, 672090), scientific consultant of «Health Academy» Innovative Clinic (Kokhansky str. 13, Chita, Russia 672038), e-mail: bi_kuznik@mail.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 12.05.2016

Введение

Не вызывает сомнений, что физическая нагрузка является одним из факторов, укрепляющих сердечно-сосудистую систему и тем самым способствующих увеличению продолжительности жизни человека [1—3]. В 2012 г. в журнале *Nature* появилось сенсационное сообщение группы исследователей онкологического института рака Даны Фарбер в Бостоне (США), работающей под руководством М. Spiegelman, где сообщалось, что во время физических упражнений в мышцах образуется особый гормон, получивший название ирисин [4]. Под воздействием ирисина происходит переход белого жира в бежевый (бурый), расход которого связан с так называемой химической терморегуляцией [4, 5]. Бежевый жир формирующийся под влиянием ирисина, способен сжигать не только жиры, но и любые другие питательные вещества, в том числе углеводы и белки.

Вскоре было опубликовано новое сенсационное сообщение, авторами которого были ученые Астонского университета (Великобритания), работающие под руководством проф. J.E. Brown [6]. Ими было установлено, что существует тесная связь между содержанием в крови ирисина и длиной теломер, являющихся точнейшими маркерами продолжительности жизни человека и животных [7—10]. Отсюда невольно возникло предположение, что увеличение продолжительности жизни у людей, занимающихся физическим трудом, связано с воздействием гормона ирисина на длину теломер [6, 10]. Более того, авторы указанных работ пришли к заключению, что уровень ирисина может быть одним из показателей, характеризующих продолжительность жизни человека.

В дальнейшем было установлено, что гормон ирисин вырабатывается не только мышцами во время работы, но и белыми адипоцитами [5, 11, 12]. Оказалось, что у людей с повышенным индексом массы тела (ИМТ), а также больных с метаболическим синдромом, содержание ирисина увеличено [13—15]. Вместе с тем, до последнего времени не установлено, как влияет физическая нагрузка на содержание ирисина в крови при компенсированных заболеваниях сердечно-сосудистой системы у больных с нормальным и повышенным ИМТ. Кроме того, не изучено зависит ли содержание вновь открытого мышечного гормона от уровня половых гормонов — эстрогена и прогестерона. Решение этих вопросов и явилось основной задачей исследования.

Методика

Исследования проведены на 41 женщине в возрасте от 32 до 69 лет с компенсированными заболеваниями сердечно-сосудистой системы (ИБС и гипертоническая болезнь 1—2 стадии). У всех фиксировали возраст, рост, вес и рассчитывали ИМТ.

Всех испытуемых разделили на 2 группы: в первую вошли 18 женщин, имеющих нормальный ИМТ, во вторую — 23 пациентки, страдающие ожирением 1 и 2 степени. Обе группы были сопоставимы по состоянию здоровья, возрасту и диагнозам (табл. 1). Кровь для исследования забиралась утром натощак и затем сразу же после осуществления комплекса физических упражнений. Содержание ирисина выявляли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с применением реактивов фирмы USCN Cloud Clone Corp на аппарате «Chem Well» (США). Определение концентрации эстрадиола и прогестерона, производилось иммунохимическим способом на аппарате «Advia Centaur» (Siemens, ФРГ). У всех испытуемых глюкозооксидазным методом на аппарате «Chem Well-combi» (США) определялся уровень глюкозы.

У обследуемых до и после физической нагрузки оценивали показатели динамометрии на ведущей руке, а также подсчитывали пульс и регистрировали кровяное давление.

Испытуемые обеих групп проходили курс кинезиотерапии по индивидуальной программе в течение 1 ч, осуществляемой на компьютеризированных линиях тренажеров (электронные блоки с питанием от сети) фирмы Technogym S.p.A. (Италия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы «Statistica 6.0.» Описание характера распределения количественных признаков осуществлено с вычислением средних величин (M) и стандартных отклонений (SD). Сравнение количественных показателей осуществляли с помощью критерия Манна—Уитни. Для оценки связи между ирисинем и другими изучаемыми показателями использован метод ранговой корреляции Спирмена. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Наблюдения показали (табл. 1), что чем больше у женщин ИМТ, тем выше в крови содержание ирисина.

В обеих группах уровень глюкозы не отличался от нормы. Вместе с тем, у женщин 2-й группы была резко снижена концентрация эстрадиола и прогестерона, что свидетельствует о более раннем наступлении менопаузы. Кроме того, в этой группе был снижен показатель мышечной силы

Учитывая приведенные данные, было решено выяснить, существуют ли корреляционные связи между уровнем ирисина, возрастом испытуемых, ИМТ, показателями динамометрии, концентрацией половых гормонов и глюкозы (табл. 2.).

Как видно из представленных данных, имеются от слабых до средней силы отрицательные корреляции между уровнем ирисина и возрастом женщин (во 2-й группе они выражены слабее). Аналогичные данные обнаружены и другими исследователями [6, 16, 17]. Одновременно выявлены отрицательные связи средней силы между концентрацией ирисина и ИМТ, что на первый взгляд не согласуется с данными других авторов [13—15]. Однако между возрастом и ИМТ корреляционные отношения в общей группе равны — 0,423, т.е. чем моложе были испытуемые, тем они обладали большим ИМТ. Следовательно, среди молодых людей возраст на уровень ирисина оказывает большее влияние, чем ИМТ. Этот факт до сих пор не был описан в литературе.

Как в 1-й, так и 2-й группе выявлены положительные связи от слабой до средней силы между концентрацией ирисина и содержанием женских половых гормонов. Следует заметить, что ранее этот факт также не был известен. В то же время обнаруженные сведения не вызывают удивления. Не подлежит сомнению, что концентрация женских половых гормонов с возрастом снижается. То же самое происходит и с уровнем ирисина, о чем свидетельствуют наши данные. Наконец, во 2-й группе установлены довольно сильные положительные связи между содержа-

ем ирисина и показателями динамометрии. В 1-й группе такой зависимости выявить не удалось

Из представленных данных вытекает, что по уровню ирисина без учета ИМТ нельзя судить о биологическом возрасте и, тем более, продолжительности жизни. У тучных людей уровень ирисина увеличен, хотя доподлинно известно, что такие люди живут меньше по сравнению с имеющими нормальный ИМТ [2, 18]. Между тем, можно с уверенностью говорить, что уровень ирисина в значительной степени определяется уровнем половых гормонов.

Большинство исследователей отмечает, что в процессе физической нагрузки содержание ирисина увеличивается [4, 19, 20]. Вместе с тем, в отдельных исследованиях указывается, что одноразовая физическая нагрузка не изменяет концентрации ирисина [21], или даже уменьшает ее [21, 22]. Было решено выяснить, как влияют одноразовые кинезитерапевтические процедуры на уровень ирисина в крови. Одновременно полученные результаты были сопоставлены с изменениями числа сердечных сокращений и уровнем кровяного давления (табл. 3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в 1-й группе, где физическая нагрузка была более интенсивной, содержание ирисина возрастало, тогда как во 2-й у части испытуемых (7 женщин) не изменялось и даже (12 женщин) снижалось.

Установленные факты позволили предположить, что вначале при физической нагрузке происходит потребление ирисина и лишь только затем, когда интенсивность физических упражнений достигает пороговой величины, уровень ирисина начинает возрастать. Следует, однако, заметить, что у людей, систематически занимающихся спортом, независимо от интенсивности нагрузки содержание ирисина всегда повышается [4, 23, 24].

Таблица 1

Содержание ирисина, половых гормонов и глюкозы у женщин с нормальным (1-я группа) и повышенным (2-я группа) ИМТ (M ± SD)

Группа	Возраст, лет	ИМТ	Ирисин, пг/мл	Эстрадиол, пг/мл	Прогестерон, нг/мл	Глюкоза, ммоль/мл	Динамометрия, кг
1-я группа	53,0 ± 3,1	24,1 ± 3,3	18,3 ± 2,3	108,3 ± 25,1	4,0 ± 2,4	4,8 ± 0,4	28,2 ± 3,0
2-я группа	56,1 ± 2,8	30,6 ± 2,8 *	25,0 ± 2,6 *	41,7 ± 7,1 *	0,9 ± 0,4 *	4,9 ± 0,4	19,5 ± 5,2 *

Примечание. * — различия между показателями 1-й и 2-й групп значимы (p<0,05)

Таблица 2

Ранговые корреляционные отношения между содержанием ирисина, возрастом, ИМТ, уровнем эстрадиола и прогестерона у женщин в 1-й и 2-й группах (по Спирмену)

Ирисин	Возраст	ИМТ	Эстрадиол	Прогестерон	Глюкоза	Динамометрия
1-я группа	-0,361	-0,428	0,309	0,462	—	—
2-я группа	-0,221	-0,365	0,215	0,350		0,635

Таблица 3

Влияние физической нагрузки на уровень ирисина, частоту пульса и среднее давление крови (M ± SD)

Показатели		Ирисин, пг/мл	Пульс	Среднее давление
1-я группа	До нагрузки	18,3 ± 2,3	70,6 ± 4,2	90,2 ± 12,0
	После нагрузки	28,5 ± 2,6 *	101,3 ± 7,2 *	98,8 ± 10,8
2-я группа	До нагрузки	25,0 ± 2,6	71,4 ± 4,7	96,4 ± 14,9
	После нагрузки	21,6 ± 3,2	100,1 ± 8,5 *	106,7 ± 13,4

Примечание. * — данные значимы до и после кинезитерапии (p<0,05)

Таблица 4

Влияние физической нагрузки на уровень ирисина в крови у женщин в зависимости от его исходного содержания (M ± SD)

Группа	Ирисин, пг/мл	
	До нагрузки	После нагрузки
С относительно низким содержанием ирисина	13,8 ± 2,2	19,9 ± 4,2 **
С относительно высоким содержанием ирисина	32,5 ± 5,3 *	32,1 ± 6,4 *

Примечание. * — данные статистически значимы между 1-й и 2-й группами (p ≤ 0,05); ** — данные статистически значимы до и после физической нагрузки (p ≤ 0,05)

Одновременно у пациенток 1-й группы выявлены положительные корреляции средней силы между концентрацией ирисина и частотой пульса лишь до физической нагрузки (+0,456) и отрицательные со средним давлением как до (-0,648), так после (-0,656) осуществления кинезитерапевтических процедур. Во 2-й группе с более низкой тренированностью взаимосвязи между перечисленными тестами не обнаружено.

Как мы уже отмечали, у людей 2-й группы с повышенным ИМТ уровень ирисина оказался увеличенным. В этой же группе содержание ирисина после кинезитерапевтических процедур, как правило, не изменялось или снижалось. Отсюда возникает предположение, что реакция на физическую нагрузку обусловлена не только интенсивностью упражнений, но и зависит от исходного содержания ирисина. Вот почему в следующей серии наблюдений мы решили изучить, как изменяется концентрация ирисина в зависимости от его исходного содержания перед физической нагрузкой (табл. 4).

Как видно из представленных данных, после физической нагрузки у женщин с относительно низким содержанием ирисина его концентрация возросла, тогда как при высоких значениях осталась без изменений.

Следует отметить, что на уровень ирисина можно воздействовать не только с помощью физических упражнений. Исследованиями, проведенными В.Х. Хавинсоном и др. [25—28], показано, что под влиянием коротких пептидов Lys-Glu (иммуномодулятор), и Glu-Asp-Arg (нейропротектор) увеличивается длина теломер, физическая и умственная работоспособность, а

также продолжительность жизни животных. Мишенями действия этих пептидов являются различные группы генов. Более того, в транскриптах гена ирисина (FNDC5) выявлены сайты связывания для пептида Glu-Asp-Arg и пептида Lys-Glu [28]. Это действие носит эпигенетический характер, так как осуществляется без изменений структуры ДНК [26, 28].

Полученные данные позволяют предполагать, что не только с помощью физических нагрузок, но и воздействуя пептидами Glu-Asp-Arg и Lys-Glu на ген FNDC5, являющийся индуктором гормона ирисина, можно значительно продлить срок жизни человека.

Выводы

1. Содержание ирисина в крови у женщин с компенсированными заболеваниями сердечно-сосудистой системы с возрастом уменьшается, что в значительной степени связано со снижением уровня половых гормонов — эстрогена и прогестерона.
2. У женщин с повышенным ИМТ уровень ирисина в крови увеличен.
3. Сразу же после окончания кинезитерапевтических процедур содержание ирисина у женщин с нормальным ИМТ возрастает, а с повышенным — в большинстве случаев не изменяется или снижается.
4. Характер ответной реакции со стороны ирисина на однократные кинезитерапевтические процедуры у женщин с компенсированными заболеваниями сердечно-сосудистой системы зависит от его исходного уровня, интенсивности физической нагрузки и степени тренированности.

References

1. Reimers C.D., Knapp G., Reimers A.K. Does physical activity increase life expectancy? A review of the literature. *Journal of Aging Research*. 2012; 9: 243-58.
2. Samitz G., Egger M., Zwahlen M. Domains of physical activity and all-cause mortality: systematic review and dose-response meta-analysis of cohort studies. *Int. J. Epidemiol*. 2011; 40: 1382-400.
3. Warburton D., Charlesworth S., Ivey A., Nettlefold L., Bredin S. A systematic review of the evidence for Canada's Physical Activity Guidelines for Adults. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*. 2010; 7: 7-39.
4. Bostrom P., Wu J., Jedrychowski M.P., Korde A., Ye L., Lo J.C. et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012; 7382: 463-8.
5. Joung K.E., Park K.H., Filippaios A., Dincer F., Christou H., Mantzoros C.S. Cord blood irisin levels are positively correlated with birth weight in newborn infants. *Metabolism*. 2015; 64 (11): 1507-14.
6. Rana K.S.I., Arif M., Hill E.J., Brown J.E. Plasma irisin levels predict telomere length in healthy adults. *Age (Dordr)*. 2014; 36 (2): 995-1001.
7. Brouillette S.W., Whittaker A., Stevens S.E., van der Harst, P., Goodall A.H., Samani N.J. Telomere length is shorter in healthy offspring of subjects with coronary artery disease: support for the telomere hypothesis. *Heart*. 2008; 94: 422-5.
8. Klelia D., Steve S., Humphri E. Telomere length in atherosclerosis and diabetes. *Atherosclerosis*. 2010; 209(1): 35-8.
9. Salpea K.D., Talmud P.J., Cooper J.A. et al. Association of telomere length with type 2 diabetes, oxidative stress and UCP2 gene variation. *Atherosclerosis*. 2010;): 45-50.
10. Vera E.I., Bernardes de Jesus, B., Foronda M. Telomerase reverse transcriptase synergizes with calorie restriction to increase health span and extend mouse longevity. *PLoS One*. 2013; 8 (1): e53760.
11. Aydin S. Three new players in energy regulation: preptin, adropin and irisin. *Peptides*. 2014; 56: 94-110.
12. Aydin S., Aydin S., Kobat M.A., Kalayci M., Eren M.N., Yilmaz M. et al Decreased saliva/serum irisin concentrations in the acute myocardial infarction promising for being a new candidate biomarker for diagnosis of this pathology. *Peptides*. 2014; 56: 141-5.
13. Pardo M., Crujeiras A.B., Amil M., Aguera Z., Jimenez-Murcia S., Banos R., Botella C., de la Torre R., Estivill X., Fagundo A.B., Fernandez-Real J.M., Fernandez-Garcia J.C., Fruhbeck G., Gomez-Ambrosi J., Rodriguez R., Tinahones F.J., Fernandez-Aranda F., Casanueva F.F. Association of irisin with fat mass, resting energy expenditure and daily activity in conditions of extreme body mass index. *Int. J. Endocrinol*. 2014; 10: e857270.
14. Crujeiras A.B., Pardo M., Arturo R.R., Navas-Carretero S., Zulet M.A., Martinez J.A. et al. Longitudinal variation of circulating irisin after an energy restriction-induced weight loss and following weight regain in obese men and women. *Am J. Hum. Biol*. 2014; 26 (2): 198-207.
15. Park K.H., Zaichenko L., Peter P., Davis C.R., Crowell J.A. and Mantzoros C.S. Diet quality is associated with circulating C-reactive protein but not irisin levels in humans. *Metabolism*. 2014; 63 (2): 233-41.
16. Tanisawa K., Taniguchi H., Sun X., Ito T., Cao Z.B., Sakamoto S., Higuchi M. Common single nucleotide polymorphisms in the FNDC5 gene are associated with glucose metabolism but do not affect serum irisin levels in Japanese men with low fitness levels. *Metabolism*. 2014; 63 (4): 574-83.
17. Ates I., Altay M., Topcuoglu C., Yilmaz F.M. Circulating levels of irisin is elevated in hypothyroidism, a case-control study. *Arch. Endocrinol Metab*. 2015; 7: 21-30.
18. Tchkonina T., Dean E. Morbeck I. et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*. 2010; 667-84.
19. Loffler D., Muller U., Scheuermann K., Jurgen K., Kenneth C., Kirkby H.H. Serum irisin levels are regulated by acute strenuous exercise. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2015; 100 (4): 1289-99.
20. Daskalopoulou S.S., Cooke A. B., Gomez Y.H., Mutter A.F., Filippaios A., Mesfum E.T., Mantzoros C.S. Plasma irisin levels progressively increase in response to increasing exercise workloads in young, healthy, active subjects. *Eur. J. Endocrinol*. 2014; 171(3): 343-52.
21. Czarkowska-Paczek B., Zendzian-Piotrowska M., Gala K., Sobol M., Paczek L. One session of exercise or endurance training does not influence serum levels of irisin in rats. *J. Physiol. Pharmacol*. 2014; 65 (3): 449-54.
22. Scalzo R.L., Peltonen G.L., Giordano G.R., Binns S.E., Klochak A.L., Paris H.L., Schweder M.M., Szallar S.E., Wood L.M., Larson D.G., Luckasen G.J., Hickey M.S., Bell C. Regulators of human white adipose browning: evidence for sympathetic control and sexual dimorphic responses to sprint interval training. *PLoS One*. 2014; 9 (6): e90696
23. Tsuchiya Y., Ando D., Takamatsu K., Goto K. Resistance exercise induces a greater irisin response than endurance exercise. *Metabolism*. 2015; 64 (9): 1042-50.
24. Norheim F., Langleite T. M., Hjorth M., et al. The effects of acute and chronic exercise on PGC-1 α , irisin and browning of subcutaneous adipose tissue in humans. *The FEBS Journal*. 2014; 281 (30): 739-49.
25. Khavinson V.Kh. Peptides and Ageing. *Neuroendocrinology Letters*. 2002; 23: 144.
26. Khavinson V.Kh., Malinin V.V. *Gerontological aspects of genome peptide regulation. Basel (Switzerland): Karger A.G.*; 2005.
27. Khavinson V.Kh., Kuznik B.I., and Ryzhak G.A. Peptide Bioregulators: A New Class of Geroprotectors. Part 1. *Advances in Gerontology*. 2013; 3: 225-35.
28. Khavinson V.Kh., Kuznik B.I., Tarnovskaya S.I., Lin'kova N.S. Short Peptides and Telomere Length Regulator Hormone Irisin. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2016; 160 (3): 347-9. (in Russian)

Сведения об авторах:

Давыдов Сергей Олегович, руководитель инновационной клиники «Академия Здоровья», доктор мед наук, проф. каф. травматологии и ортопедии ЧГМА, засл. врач РФ, e-mail: davydov-so@mail.ru;

Степанов Александр Валентинович, зав. каф. медицины катастроф ЧГМА, доктор мед. наук, проф., e-mail: avstep@rambler.ru

Морарь Наталия Викторовна, заместитель руководителя клиники Академия здоровья» по медицинским инновациям, науч. сотр., e-mail: morarr@mail.ru

© Коллектив авторов, 2016
УДК 615.015.2

Валеев В.В.¹, Трашков А.П.¹, Коваленко А.Л.², Петров А.Ю.¹, Васильев А.Г.¹

Новый вазодилататор натрия-L-аргинина сукцинат в профилактике и лечении доxorубин-индуцированной кардиотоксичности

¹ — ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН», 194223, Санкт-Петербург, просп. Тореза, д. 44

² — ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1

Цель исследования — изучение кардиопротективного действия натрия-L-аргинина сукцината при поражении миокарда крыс доxorубицином. **Методика.** Эффективность препарата оценивали по динамике морфометрических и биохимических изменений, отражающих интенсивность перекисного окисления и структурно-функциональные изменения в миокарде. **Результаты.** Показано, что использование натрия-L-аргинина сукцината для профилактики и лечения антрациклиновой кардиомиопатии снижает кардиотоксическое действие доxorубина, уменьшая масштаб деструкции кардиомиоцитов, степень дисфункции левого желудочка и выраженность гипертрофии миокарда.

Ключевые слова: аргинин; доxorубин; янтарная кислота; антрациклиновая кардиомиопатия; перекисное окисление.

Для цитирования: Валеев В.В., Трашков А.П., Коваленко А.Л., Петров А.Ю., Васильев А.Г. Новый вазодилататор натрия-L-аргинина сукцинат в профилактике и лечении доxorубин-индуцированной кардиотоксичности. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 52–57.

Для корреспонденции: Валеев Вадим Владиславович, науч. сотр. ИЭФБ РАН, e-mail: vadimvaleev81@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.08.2016

Valeev V.V.¹, Trashkov A.P.¹, Kovaleko A.L.², Petrov A.U.¹, Vasiliev A.G.¹

Sodium-L-arginine succinate — a new vasodilating medicine for the treatment and prophylaxis of doxorubicin-induced cardiotoxicity

¹ — I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences; 44, Pr. Morisa Toreza, St.Petersburg, Russia, 194223

² — Toxicology Institute of the Federal Medical and Biological Agency; 1, ul. Bekhtereva, St.Petersburg, Russia, 192019

The purpose: to ascertain possible cardioprotective effect of Sodium-L-arginine Succinate in case of myocardial lesions caused by Doxorubicin in rats. **Methods.** The effectiveness of the drug was assessed by morphometric and biochemical changes reflecting peroxidation intensity and structural and functional changes in myocardium. **Results.** Sodium-L-arginine Succinate used for the treatment and prophylaxis of antracyclenic cardiomyopathy was demonstrated to decrease Doxorubicin effects lessening cardiomyocytal destruction and the left ventricular dysfunction with myocardial hypertrophy.

Keywords: arginine; Doxorubicin; succine acid; antracyclenic cardiomyopathy; peroxidation.

For citation: Valeev V.V., Trashkov A.P., Kovaleko A.L., Petrov A.U., Vasiliev A.G. Sodium-l-arginine succinate — a new vasodilating medicine for the treatment and prophylaxis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Patologicheskaya fiziologiya i ehksperimentalnaya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2016; 60(4): 52–57. (in Russ).

For correspondence: Vadim V. Valeev, Researcher work I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences; 44, Pr. Morisa Toreza, St.Petersburg, 194223, Russian Federation, e-mail: vadimvaleev81@mail.ru

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

Funding: The study had no sponsorship.

Received 16.08.2016

Введение

Доксорубин — противоопухолевый антибиотик антрациклинового ряда, впервые получен специалистами итальянской фармацевтической компании Farmitalia Research Laboratories в середине XX века. Высокая эффективность доксорубина в отношении опухолей кроветворной системы, молочной железы, желудочно-кишечного тракта и других новообразований подтверждена в ходе многочисленных экспериментальных и клинических исследований [1, 2]. Однако противоопухолевое действие доксорубина не является избирательным, и его применение существенно ограничивается токсическим воздействием на интактные ткани. Основным лимитирующим фактором при назначении доксорубина является кардиотоксичность препарата, которая может быть острой или хронической. Острая кардиотоксичность развивается во время приема доксорубина или в течение 3 сут. после его отмены и проявляется в виде миоперикардита с нарушениями сердечного ритма, реже — в форме острой левожелудочковой недостаточности. Хроническая кардиотоксичность, связанная с кумулятивным действием препарата и клинически проявляется спустя месяцы после лечения доксорубином в виде снижения систолической функции левого желудочка и развития хронической сердечной недостаточности [2—4].

Механизмы доксорубин-индуцированной кардиотоксичности в настоящее время изучены недостаточно, несмотря на более чем, полувековую историю применения в онкологической практике. Предполагается, что механизмы гибели кардиомиоцитов опосредованы избыточной активацией свободнорадикальных процессов и/или изменением цитокинового баланса и эндокринного статуса пациентов, вызванными терапией доксорубином [2, 5]. Экспериментальные исследования показали, что доксорубин снижает внутриклеточную концентрацию макроэргических соединений — аденозинтрифосфорной кислоты и фосфокреатинина в кардиомиоцитах [6—8]. Наряду с дисфункцией митохондрий причинами развития энергодифицитного состояния сердечной мышцы могут быть снижение утилизации кардиомиоцитами энергетических субстратов (глюкозы, жирных кислот) [9] и нарушение функции кретинофосфокиназы [10].

Доксорубин-индуцированная кардиотоксичность является одной из наиболее частых причин отмены препарата, увеличения длительности интервала времени до его последующего введения или снижения эффективной дозы. Это приводит к изменению схемы терапии и ухудшению прогноза лечения. В качестве средств фармакологической кардиопротекции широко используют арсенал антигипертензивных и кардиото-

нических препаратов (ингибиторы АПФ, бета-блокаторы), заимствованных из кардиологической практики [11, 12]. Однако их лекарственное взаимодействие с цитостатическими препаратами и эффективность применения изучены недостаточно.

Цель исследования — изучение кардиопротективного действия нового препарата натрия-L-аргинина сукцината («Унифузол®», ООО «НТФФ ПОЛИСАН», Россия) при поражении миокарда крыс доксорубином.

Методика

Исследование проводилось на 102 самцах альбиносах серых крыс (*Rattus, John Berkenhout, 1769*), массой тела 200—220 г, разведения ФГУП ПЛЖ «Раполово» РАМН (Ленинградская область). Подопытные крысы после поступления из питомника проходили 14-дневный карантин в карантинном блоке вивария с целью исключения из эксперимента животных с соматической и/или инфекционной патологией. После завершения периода карантина, предусматривался дополнительный (1 сут.) период адаптации животных к основному помещению вивария.

Содержание, питание и контроль состояния животных, все виды манипуляций и эвтаназию производили в соответствии с нормами биоэтики и законодательства Российской Федерации, регламентирующими работы с использованием лабораторных животных (ГОСТ 33044 — 2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (OECD Guide 1:1998, IDT); *European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg. 18.III.1986. European Treaty Series — № 123*) [13].

Рандомизацию животных осуществляли методом случайных чисел. Были выделены 3 экспериментальные группы:

1. «Контроль» (n = 12) — интактные животные без признаков инфекционной и/или соматической патологии для анализа нормальных значений исследуемых показателей.

2. «Доксорубин» (n = 45) — животные, которым интраперитонеально вводился доксорубин с последующим анализом определяемых показателей в контрольных точках исследования: 3-и, 10-е и 28-е сут. после введения доксорубина.

3. «Унифузол» (n = 45) — животные, которым вводился доксорубин и далее в течение 10 сут. проводилось лечение препаратом «Унифузол» в объеме 2,5 мл внутривенно с последующим анализом определяемых показателей в контрольных точках исследования. Первое введение препарата производили через 45 мин после применения цитостатика.

С целью моделирования доксорубициновой интоксикации использовали препарат «Доксорубин Эбеве» (EBEWE Pharma Ges.mbH Nfg. KG, Австрия). Используемая доза препарата — 12,6 мг/кг массы тела животного, составляет LD₅₀ для крыс (инструкция по медицинскому применению препарата «Доксорубин Эбеве»). Взятие крови производили путём транскутанной пункции сердца животных в условиях общего обезболивания (инъекционный золетилловый наркоз, 0,7 мл/кг массы тела, внутривенно) в вакуумную систему Monovette (SARSTEDT, Германия) с антикоагулянтом (КЗ-ЭДТА) в объеме 6 мл.

Для анализа функционального состояния миокарда и степени выраженности кардиотоксического действия доксорубина определяли содержание в крови кардиоспецифических маркеров: креатининфосфокиназы-МВ (КФК-МВ) и предсердного натриуретического пептида (NT-proBNP). Состояние антиоксидантной системы и интенсивность перекисного окисления оценивали по уровню каталазы крови, супероксиддисмутазы (СОД) и концентрации малонового диальдегида (МДА).

После окончания взятия крови с целью морфометрического исследования органа-мишени производили быстрое вскрытие грудной клетки животного и осторожное извлечение сердца и легких. Необходимые фрагменты иссекались и погружались в 10% нейтральный забуференный формалин на 48 ч. Обработку материала производили общепринятым способом и заливали в парафин. Срезы окрашивали и проводили изучение ткани сердца методом световой микроскопии. Оценивали: геометрию, массо-ростовой коэффициент, стромальный компонент и микроциркуляторное русло органа.

Статистическую обработку производили при помощи программы SPSS. Данные приведены в виде $M \pm SE$ (средняя арифметическая \pm ошибка средней арифметической). Проверка характера распределения данных производилась путем расчета критерия Колмогорова—Смирнова. Сравнение средних данных независимых выборок осуществляли при помощи критерия Стьюдента (при нормальном характере распределения вариант в выборочной совокупности) и U-критерия Манна—Уитни (при распределении вариант в выборочной совокупности, отличном от нормального). Статистически значимыми различиями считали вероятность не менее 95% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Введение подопытным животным доксорубина приводило к развитию выраженных нарушений со стороны органов сердечно-сосудистой, гепатобилиарной, эндокринной и мочевыделительной систем.

Интегральным показателем, позволяющим оценить степень тяжести патологического процесса и, как следствие, уровень напряженности используемой модели, является уровень летальности крыс в обследуемых группах (табл. 1).

Результаты определения уровня летальности в экспериментальных группах подтверждают обоснованность выбора и напряженность использованной модели патогенеза доксорубициновой интоксикации. Полиорганная недостаточность, развившаяся вследствие введения доксорубина, приводила к гибели более 50% подопытных животных, не получавших до этого лечение исследуемым препаратом (LD₅₈, табл. 1). Гибель животных в первые 3-е сут. (46%) была обусловлена острой интоксикацией (синдром полиорганной недостаточности), непосредственную причину

Таблица 1
Влияние препарата «Унифузол» на летальность подопытных крыс с антрациклиновой кардиомиопатией

Группа	Период наблюдений	Летальность		
		Количество павших особей	Процент от исходного объема выборки в группе	95% ДИ
Контроль	Общая летальность	У контрольных животных летальность не регистрировалась		
Доксорубин	72 ч	12	46	26,6—66,6
	3—10-е сут.	4	15	4,4—34,9
	11—28-е сут.	10	39	20,2—59,4
	Общая летальность	26	58	42,2—72,3
Унифузол	72 ч	8	67	34,9—90,1
	3—10-е сут.	2	17	2,1—48,4
	11—28-е сут.	2*	17	2,1—48,4
	Общая летальность	12*	27	14,6—41,9

Примечание. * — отличия с показателями группы "Доксорубин" статистически значимы ($p < 0,05$)

смерти установить не удалось ни у одной особи вследствие глубоких нарушений всех видов метаболизма, выраженной дисфункции системы кровообращения, интерстициального отека внутренних органов и развития системных отеков (асцит, плеврит). Гибель крыс в отсроченный период эксперимента (39%) была во всех случаях вызвана доксорубицин-индуцированной кардиомиопатией.

Применение Унифузола для лечения доксорубицин-индуцированной полиорганной недостаточности оказало выраженный терапевтический эффект, что выразилось в статистически значимом снижении показателя летальности крыс в 2,2 раза по сравнению с группой животных, не получавших фармакологической поддержки (27% и 58% соответственно). Профиль летальности, на фоне терапии Унифузолом, подвергся выраженной коррекции: удельный вес погибших животных был максимальным в первые 72 ч (период острой интоксикации — грубого сдвига гомеостатических параметров), гибель животных в отсроченный период эксперимента (с 11-х по 28-е сут.) от развившихся осложнений и, прежде всего, антрациклиновой кардиомиопатии, была минимальной (табл. 1).

Серьезные метаболические расстройства организма экспериментальных животных находили отражение в активации процессов перекисного окисления и выраженной депрессии активности ферментативного звена антиоксидантной системы. Это отражалось в прогрессивном увеличении концентрации малонового диальдегида в крови крыс, сопровождающемся умеренным уменьшением активности основных антиоксидантных ферментов (табл. 2).

Применение Унифузола приводило к умеренной коррекции наблюдаемых нарушений комплекса биологического окисления в организме подопытных животных (табл. 2). На 10-е сут. на фоне терапии на-

блюдалось статистически значимое снижение содержания МДА в крови крыс в среднем на 31% ($p < 0,05$) и одновременное увеличение активности СОД на 55%.

Нормализация работы кардиомиоцитов отразилась на динамике кардиоспецифических маркеров в крови подопытных животных (табл. 3).

Максимальный уровень КФК-МВ в обеих экспериментальных группах был зарегистрирован к 28-м сут. наблюдения: в группе «Доксорубицин» он в 10,8 раза превышал аналогичный показатель у интактных крыс. Проводимое лечение способствовало статистически значимому уменьшению уровня КФК-МВ — к окончанию эксперимента его содержание в крови крыс группы «Унифузол» было в 3 раза ниже, чем у нелеченных животных, однако, значение превышало контрольные значения (табл. 3).

Схожие различия наблюдались при оценке уровня NT-проBNP, характеризующего дисфункцию левого желудочка и степень сердечной недостаточности: к 28-м сут. эксперимента он повысился в группе «Доксорубицин» в 2 раза, в группе «Унифузол» только в 1,3 раза по сравнению с контрольным значением показателя (табл. 3). При этом наблюдались статистически значимые различия между группами «Доксорубицин» и «Унифузол».

Морфологическое исследование органа-мишени подтвердило наличие структурно-функциональных изменений миокарда у крыс с доксорубициновой интоксикацией, которые заключались в увеличении массо-ростового коэффициента без значимых изменений стромального компонента. Эти изменения были наиболее выражены в группе животных, не получивших фармакологическую поддержку Унифузолом. Обращает на себя внимание разнонаправленный характер изменений микроциркуляторного русла: в то время как в группе «Доксорубицин» ин-

Таблица 2

Влияние препарата «Унифузол» на состояние ферментов антиоксидантной системы и интенсивность перекисного окисления у крыс с антрациклиновой кардиомиопатией (M ± SE)

Группы	Период наблюдений	n	Исследуемые показатели		
			СОД, у.е./мл	Каталаза, у.е./мл	МДА, ммоль/л
Контроль	0-е сут.	12	7,3 ± 0,41	0,15 ± 0,05	12,1 ± 0,44
Доксорубицин	3-и сут.	7	2,3 ± 1,04*	0,16 ± 0,06	34,1 ± 4,52*
	10-е сут.	6	4,9 ± 2,15	0,23 ± 0,04	35,7 ± 5,52*
	28-е сут.	6	5,8 ± 1,62	0,24 ± 0,06	30,9 ± 2,91*
Унифузол	3-и сут.	10	3,6 ± 0,79*	0,22 ± 0,03	27,2 ± 3,62*
	10-е сут.	12	7,6 ± 0,52	0,22 ± 0,06	24,5 ± 2,91*. ¹
	28-е сут.	11	5,6 ± 0,76*	0,25 ± 0,05	28,0 ± 5,10*

Примечание. * — отличия с показателями группы «Контроль» статистически значимы ($p < 0,05$); ¹ — отличия с показателями группы «Доксорубицин» статистически значимы ($p < 0,05$)

Таблица 3

Влияние препарата «Унифузол» на динамику содержания кардиоспецифических маркеров в крови подопытных крыс с антрациклиновой кардиомиопатией (M ± SE)

Группы	Период наблюдений	n	Исследуемые показатели	
			КФК-МВ, нг/мл	NT-proBNP, нг/мл
Контроль	0-е сут.	12	4,4 ± 0,96	72,0 ± 7,08
Доксорубин	3-и сут.	7	17,7 ± 2,05*	92,0 ± 8,12*
	10-е сут.	6	21,3 ± 3,17*	108,1 ± 10,06*
	28-е сут.	6	47,4 ± 15,11*	145,7 ± 16,00*
Унифузол	3-и сут.	10	13,2 ± 5,15*	82,1 ± 7,52
	10-е сут.	12	6,5 ± 1,96 ¹	90,3 ± 6,51*
	28-е сут.	11	15,6 ± 3,31*. ¹	91,1 ± 8,08*. ¹

Примечание. * — отличия с показателями группы «Контроль» статистически значимы (p<0,05); ¹ — отличия с показателями группы «Доксорубин» статистически значимы (p<0,05).

Таблица 4

Влияние препарата «Унифузол» на массо-ростовой коэффициент, дистрофические изменения и состояние микроциркуляторного русла у крыс с антрациклиновой кардиомиопатией

Группа	n	Массо-ростовой коэффициент (%)	Клеточно-стромальный коэффициент	Плотность микроциркуляторного русла
Контроль	12	0,44 ± 0,05	0,89	327,2 ± 12,34
Доксорубин, 3-и сут.	7	0,48 ± 0,08	0,92	198,8 ± 9,66*
Доксорубин, 10-е сут.	6	0,64 ± 0,10*	0,81	162,4 ± 11,42*
Доксорубин, 28-е сут.	6	0,85 ± 0,08*	0,66	180,5 ± 20,64*
Унифузол, 3-и сут.	10	0,44 ± 0,10	0,88	211,8 ± 37,89 *
Унифузол, 10-е сут.	12	0,52 ± 0,09	0,89	569,3 ± 44,00 *, ¹
Унифузол, 28-е сут.	11	0,61 ± 0,07*. ¹	0,75	682,1 ± 78,21 *, ¹

Примечание. * — отличия с показателями группы «Контроль» статистически значимы; ¹ — отличия с показателями группы «Доксорубин» статистически значимы

токсикация цитостатиком приводила к существенному снижению плотности микроциркуляторного русла, в группе крыс, получивших курс Унифузола, отмечался рост данного показателя в 2,1 раза по сравнению с контролем (p<0,05) к концу периода наблюдения (табл. 4).

Выводы

Полученные результаты исследования позволяют сформулировать следующие выводы:

1. Применение раствора натрия-L-аргинина сукцината («Унифузол») ослабляет кардиотоксическое действие доксорубина, уменьшая масштаб деструкции кардиомиоцитов, степень дисфункции левого желудочка и выраженность гипертрофии миокарда.

2. Механизмы кардиопротективного действия Унифузола заключаются прежде всего в торможении процессов свободнорадикального окисления и выраженном ангиопротективном действии.

References

1. Carvalho C., Santos R.X., Cardoso S., Correia S., Oliveira P.J., Santos M.S., Moreira P.I. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem.* 2009; 16: 3267-85.
2. Chatterjee K., Zhang J., Honbo N., Karliner J.S. Doxorubicin Cardiomyopathy. *Cardiology.* 2010; 115(2): 155-62.
3. Takemura G., Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007; 49: 330-52.
4. Swain S.M., Whaley F.S., Ewer M.S. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin. A retrospective analysis of three trials. *Cancer.* 2003; 97: 2869-79.
5. Vasyuk Yu.A., Shkolnik E.L., Nesvetov V.V. et al. Myocardial metabolic background on chemotherapy and means of their correction Consilium medicum. *Kardiosomatika.* 2013; 4(2): 11-5. (In Russian)
6. Jayaseelan R., Poizat C., Wu H.Y., Kedes L. Molecular mechanisms of doxorubicin-induced cardiomyopathy. Selective suppression of Reiske iron-sulfur protein, ADP/ATP translocase, and phosphofructokinase genes is associated with ATP depletion in rat cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 1997; 272: 5828-32.

7. Pelikan P.C., Weisfeldt M.L., Jacobus W.E. et al. Acute doxorubicin car-diototoxicity: functional, metabolic, and morphologic alterations in the isolated, perfused rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1986; 8: 1058-66.

8. Nicolay K., Aue W.P., Seelig J. et al. Effects of the anti-cancer drug ad-riamycin on the energy metabolism of rat heart as measured by in vivo ³¹P-NMR and implications for adriamycin-induced cardiotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* 1987; 929: 5-13.

9. Wakasugi S., Fischman A.J., Babich J.W. et al. Myocardial substrate utilization and left ventricular function in adriamycin cardiomyopathy. *J Nucl Med.* 1993; 34: 1529-35.

10. Tokarska-Schlattner M., Wallimann T., Schlattner U. Multiple interference of anthracyclines with mitochondrial

creatine kinases: preferential damage of the cardiac isoenzyme and its implications for drug cardiotoxicity. *Mol Pharmacol.* 2002; 61: 516-23.

11. Vasyuk Yu.A., Shkolnik E.L., Nesvetov V.V. et al. Anthracycline cardiotoxicity: Prospects for using ivabradine. *Consilium Medicum. Kardiosomatika.* 2012; 3 (4): 65-9. (In Russian)

12. Legha S.S., Wang Y.M., Mackay B. et al. Clinical and pharmacologic investigation of the effects of alpha-tocopherol on adriamycin cardiotoxicity. *Ann N Y Acad Sci.* 1982; 393: 411-8.

13. Matjushin A.S., Osnjach V.S., Pavlova T.N. *Deontology of medical and biological experiments [Deontologija mediko-biologicheskogo jeksperimenta]*. Moscow; 1987. (In Russian)

Сведения об авторах:

Трашков Александр Петрович, канд. мед. наук, зав. отделом экспериментальной фармакологии ИЭФБ РАН

Коваленко Алексей Леонидович, доктор биол. наук, доцент, вед. науч. сотр. ФГБУН ИТ ФМБА

Петров Андрей Юрьевич, канд. фарм. наук, науч. сотр. ИЭФБ РАН

Васильев Андрей Глебович, доктор мед. наук, проф., науч. сотр. ИЭФБ РАН

© Гурьянов М.И., 2016
УДК 636.09.619

Гурьянов М.И.

Организованная структура фибрилляции желудочков у собак с ишемией миокарда

Санкт-Петербургский государственный университет, Медицинский факультет,
199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7/9

Цель исследования. Выявление и изучение организованной активности фибрилляции желудочков (ФЖ) у собак с ишемией миокарда путем анализа электрокардиограммы (ЭКГ) при ФЖ. **Методика.** Проведено 4 опыта на собаках с ишемией миокарда до воспроизведения ФЖ. Регистрировали ЭКГ собаки в течение 2 мин до ФЖ и в течение первых 10 мин свободного развития ФЖ. ФЖ вызывали стимуляцией грудной клетки собаки переменным током (50 Гц; 30 В) в течение 2—3 с. Проводили частотно-амплитудный (спектральный) анализ односекундных отрезков ЭКГ при ФЖ методом быстрого преобразования Фурье (БПФ). БПФ в 5 диапазонах частот: очень низкие частоты (1—3 Гц), низкие (4—7 Гц), средние (8—12 Гц), высокие (13—17 Гц) и очень высокие частоты (18—40 Гц). Определяли спектральную мощность (мкВ) и удельный вес (%) осцилляций очень низких частот, низких, средних, высоких и очень высоких частот в пятисекундных отрезках ЭКГ при ФЖ. **Результаты.** Установлено, что на 1-й мин ФЖ у собак с ишемией миокарда до развития ФЖ доминировали осцилляции низких частот (4—7 Гц). На 2—3-й мин ФЖ доминирование осцилляций низких частот сменялось доминированием осцилляций низких и средних частот (4—12 Гц). На 4—10-й мин ФЖ доминировали осцилляции низких и средних частот. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что первые 10 мин ФЖ у собак с предшествующей ишемией миокарда характеризуются организованной активностью, на что указывает доминантная структура частот осцилляций ЭКГ. Организованная структура ФЖ устойчива к ишемии: организованная структура сохранялась в течение 10 мин воздействия ишемии на миокард при ФЖ.

Ключевые слова: фибрилляция желудочков; ишемия миокарда; организованная активность; доминантная частотная структура.

Для цитирования: Гурьянов М.И. организованная структура фибрилляции желудочков у собак с ишемией миокарда. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 58—63.

Для корреспонденции: Гурьянов Марат Ильич, доктор мед. наук, проф. каф. основ медицинских и специальных знаний медицинского факультета Санкт-Петербургского государственного университета, e-mail: mgurianov@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.10.15

Gurianov M.I.

Organized structure of ventricular fibrillation in dogs with myocardial ischaemia

St. Petersburg State University, Faculty of Medicine, 7/9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199106, Russia

The purpose of investigation. To reveal and study the organized activity of ventricular fibrillation (VF) in dogs with myocardial ischaemia before VF using the spectral analysis of electrocardiogram (ECG) in VF by the method of Fast Fourier Transform (FFT). **Methods.** Four experiments was carried on dogs with myocardial ischaemia before VF. The ECG in dogs was recorded during 2 minutes before VF and within the first 10 minutes of VF, which was caused under stimulation the chest of the dog by alternating current (50 Hz; 30 V) within 2—3 seconds. The spectral analysis of ECG in VF was carried using the method of FFT in 5 frequency bands: very low frequencies (1—3 Hz), low (4—7 Hz), medium (8—12 Hz), high (13—17 Hz) and very high frequencies (18—40 Hz). The spectral power (μV) and proportion (%) of oscillations was determined in five-second intervals of ECG during VF in the range of the very low frequencies, low, medium, high and the very high frequencies. **Results.** The low frequency oscillations of 4—7 Hz dominated during the first minute of VF in dogs with myocardial ischaemia before VF. Domination of the low frequency oscillations was replaced by domination of the low and medium frequency oscillations of 4—12 Hz during the second and third minutes of VF. The low and medium frequency oscillations dominated at 4—10-th minutes of VF. **Conclusion.** The first 10 minutes of VF in dogs with myocardial ischaemia before VF are characterized by an organized activity that confirmed by dominant frequency structure of the ECG oscillations. Organized structure of VF is resistant to ischaemia: an organized structure persisted under

the influence of 10 minutes of myocardial ischaemia during VF.

Keywords: ventricular fibrillation; myocardial ischaemia; organized activity; dominant frequency structure.

For citation: Gurianov M.I. Organized structure of ventricular fibrillation in dogs with myocardial ischaemia. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(4): 58—63. (In Russian).

For correspondence: Marat I. Gurianov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Faculty of Medicine, St. Petersburg State University, 7/9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199106, Russian Federation, e-mail: mgurianov@yandex.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors: Gurianov M.I., <http://orcid.org/0000-0002-4666-8220>

Received 11.10.15

Введение

Фибрилляция желудочков (ФЖ) является основной причиной внезапной сердечной смерти [1]. Частота внезапной сердечной смерти в России составляет 450—600 тыс. случаев в год [2], во всем мире — от 3 до 7 млн в год [3, 4], поэтому ФЖ продолжает оставаться актуальной проблемой, определяющей безопасность жизнедеятельности и качество жизни населения.

Картирование миокарда показало, что электрическая активность является организованной в первые 2 мин ФЖ, но становится дезорганизованной после 2-й мин [5—7]. Однако организованная активность выявлена при развитии ФЖ в нормальном миокарде, при этом отсутствовали точные количественные критерии организованной ФЖ, а картирование охватывало не более 20% эпикардиальной поверхности желудочков, тогда как ФЖ охватывает весь миокард желудочков. Следует отметить, что только в 10—20% случаев ФЖ развивается в нормальном миокарде [2, 8]. В 80—90% случаев ФЖ развивается на фоне кардиальной патологии, чаще всего ишемической болезни сердца [1, 2, 9]. Сведений о выявлении и количественной характеристике организованной активности при развитии ФЖ на фоне предшествующей ишемии миокарда в литературе нет. Поэтому выявление и изучение организованной активности при ФЖ, развивающейся на фоне ишемии миокарда — наиболее частой причине ФЖ чрезвычайно актуально. Существует предположение, что параметры электрической дефибрилляции могут быть разными при организованной и неорганизованной ФЖ [10].

Цель работы — выявление и изучение организованной активности ФЖ у собак с предшествующей ишемией миокарда.

Методика

ЭКГ характеризует интегральную электрическую активность сердца, а БПФ позволяет количественно определять частотно-амплитудный состав осциллирующей ЭКГ при ФЖ [6, 11, 12]. Всего было проведено

24 опыта на сердце собаки *in situ*, из которых в представленную работу вошла группа из 4 собак с признаками ишемии миокарда до воспроизведения ФЖ. Опыты проводились в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985) и Приказом Министерства высшего и среднего специального образования СССР № 742 от 13.11.1984 «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Каждому животному проводили общую анестезию внутримышечным введением золетила (20 мг/кг; «Virbac Sante Animale»). Через 5 мин после анестезии в конечности собаки вкалывали 4 электрода для регистрации ЭКГ. В грудную клетку в области сердца вкалывали 2 электрода для электростимуляции.

У всех собак регистрировали ЭКГ в течение 1—2 мин в III стандартном отведении на электрокардиографическом канале регистратора «NeuroS-4U» («Нейроботикс») при частоте оцифровки 500 Гц. Затем стимулировали грудную клетку переменным током (50 Гц; 30 В) в течение 2—3 с, что приводило к ФЖ у всех собак. Известно, что стимуляция грудной клетки собаки переменным током частотой 50 Гц и напряжением 30 В всегда приводит к ФЖ у собак [13].

У 20 собак — эти собаки не вошли в работу — не определялись патологические изменения на ЭКГ до ФЖ. У 4 собак — эти собаки вошли в работу — определялись электрокардиографические признаки ишемии миокарда до ФЖ как показано на рис. 1.

На ЭКГ выявляется смещение сегмента ST ниже изолинии на 0,2—0,4 мВ (рис. 1), что указывает на ишемию миокарда до ФЖ. Известно, что смещение сегмента ST электрокардиограммы ниже изолинии на 1 мм (это соответствует смещению сегмента ST ниже изолинии на 1 мВ при стандартной в практике электрокардиографии калибровке ЭКГ: 1 мВ равен 10 мм) является электрокардиографическим признаком ишемии миокарда [14].

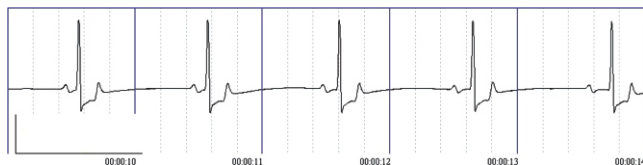


Рис. 1. ЭКГ собаки с ишемией миокарда до стимуляции грудной клетки собаки переменным током 50 Гц и 30 В и развития ФЖ. 10–14-я секунды регистрации ЭКГ собаки. Калибровка ЭКГ: 1 мВ, 1 с.

Следует отметить, что ишемия миокарда до ФЖ не связана с применявшейся анестезией. Золетил не вызывает ишемию миокарда собаки [15]. Ишемия миокарда до ФЖ была случайной находкой.

Регистрировали ЭКГ при ФЖ в течение первых 10 мин свободного развития ФЖ. Проводили частотно-амплитудный (спектральный) анализ односекундных отрезков ЭКГ при ФЖ методом БПФ с использованием программы «Неокортекс» («Нейроботикс»). Спектральный анализ проводили в 5 диапазонах частот: очень низкие частоты (1–3 Гц), низкие частоты (4–7 Гц), средние частоты (8–12 Гц), высокие частоты (13–17 Гц) и очень высокие частоты (18–40 Гц).

Определяли спектральную мощность (амплитуду) (в мкВ) и удельный вес (в %) осцилляций очень низких частот, низких частот, средних частот, высоких частот и очень высоких частот в односекундных отрезках ЭКГ; при этом суммарную амплитуду осцилляций частотой 1–40 Гц принимали за 100%, как показано в таблице. Затем определяли амплитуду и удельный вес осцилляций очень низких частот, низких частот, средних частот, высоких частот и очень высоких частот в пятисекундных отрезках ЭКГ у всех собак ($M \pm m, n = 20$).

Статистическую обработку проводили с использованием программы «SPSS 11.5» непараметрическими методами: сравнение по критериям Манна–Уитни и Вилкоксона, определение корреляционной связи по Спирмену.

Результаты и обсуждение

На 1-й мин ФЖ на ЭКГ доминировали осцилляции низких частот (4–7 Гц); доминирование осцилляций низких частот отражают спектрограммы (рис. 2).

На 136–140-й с на ЭКГ регистрировались полиморфные осцилляции частотой от 1 до 25 Гц, но спектрограмма показывает доминирование осцилляций низких и средних частот (4–12 Гц). Доминантная структура ФЖ статистически значима для всех собак с ишемией миокарда. Осцилляции низких частот, на долю которых приходится только 4/40 в диапазоне от 1 до 40 Гц, содержали от 34 до 44% спектральной мощности и доминировали в структуре частот осцилляций на 1-й — 2-й мин ФЖ, а осцилляции низких и средних частот, занимающие 9/40 частотного диапазона, содержали от 48 до 63% спектральной мощности и доминировали на 3-й–10-й мин (рис. 3).

Первая минута ФЖ характеризовалась доминированием осцилляций низких частот, при этом практически не снижалась амплитуда осцилляций всех пяти частотных диапазонов (рис. 4). Вторая и третья минуты характеризовались движением от доминирования осцилляций низких частот к доминированию осцилляций низких и средних частот. Такая динамика частотной структуры связана со статистически значимым снижением от 42 до 30% удельного веса осцилляций низких частот и возрастанием от 18 до 26% удельного веса осцилляций средних частот на 2-й — 3-й мин ФЖ (рис. 3). В свою очередь, динамика удельного веса осцилляций низких и средних частот связана с динамикой амплитуды осцилляций этих частот. Амплитуда осцилляций низких частот статистически значимо снижалась от 588 до 347 мкВ, а средних частот значимо возрастала от 252 до 301 мкВ (рис. 4). Имеется высокая статистически значимая корреляционная связь между амплитудой и удельным весом осцилляций низких частот ($r_s = 1$) и средних частот ($r_s = 0,94$) на 2-й — 3-й мин ФЖ. На 4-й — 10-й мин монотонно значимо снижалась амплитуда осцилляций всех 5 частотных диапазонов; имеется высокая корреляционная связь между длительностью ФЖ и амплитудой осцилляций разных частот (рис. 4). Снижение амплитуды осцилляций всех частотных диапазонов сопровождалось сохранением структуры с доминированием осцилляций низких и средних частот на 4-й — 10-й мин ФЖ.

В нашей работе впервые показано, что ФЖ у собак с ишемией миокарда характеризуется доминантной структурой частот осцилляций, что свидетельствует об организованной (синхронизированной) активности миокарда. Если бы кардиомиоциты генерировали

Таблица

Амплитуда и удельный вес осцилляций разных частот односекундного отрезка ЭКГ собаки на 9-й секунде ФЖ

Частота осцилляций	1–3 Гц	4–7 Гц	8–12 Гц	13–17 Гц	18–40 Гц	1–40 Гц
Амплитуда, мкВ	392	810	266	146	162	1776
Удельный вес, %	22	46	15	8	9	100

потенциалы действия в случайном порядке, то потенциалы, случайно суммируясь, давали бы случайный суммарный процесс на ЭКГ с равномерно распределенной спектральной плотностью в диапазоне от 1 до 40 Гц. Доминирование осцилляций низких частот отражает, по-видимому, синхронизованную активность кардиомиоцитов, генерирующих потенциалы действия частотой от 4 до 7 Гц. При развитии ФЖ при ишемии миокарда кардиомиоциты генерировали потенциалы действия частотой 4–6 Гц [12, 16]. Организованная активность практически не снижалась на 1-й мин ФЖ (рис. 3). Это подтверждается также тем, что амплитуда осцилляций всех частот статистически значимо не изменялась на 1-й мин (рис. 4). Извест-

но, что дезорганизованная активность характеризуется противопоставлением локальных электрических векторов друг другу, приводящим к снижению амплитуды [17].

Ишемия приводит к повышению внеклеточной концентрации калия вследствие утечки ионов калия из внутриклеточной жидкости, что в свою очередь приводит к снижению проводимости и электрическому разобщению нексусов [18]. Нарастание ишемии должно приводить к прогрессирующему угнетению проводимости и разобщению нексусов и, исходя из теоретических предпосылок, к дезорганизованной активности. В наших опытах проводимость миокарда несомненно снижалась под влиянием ишемии, но не

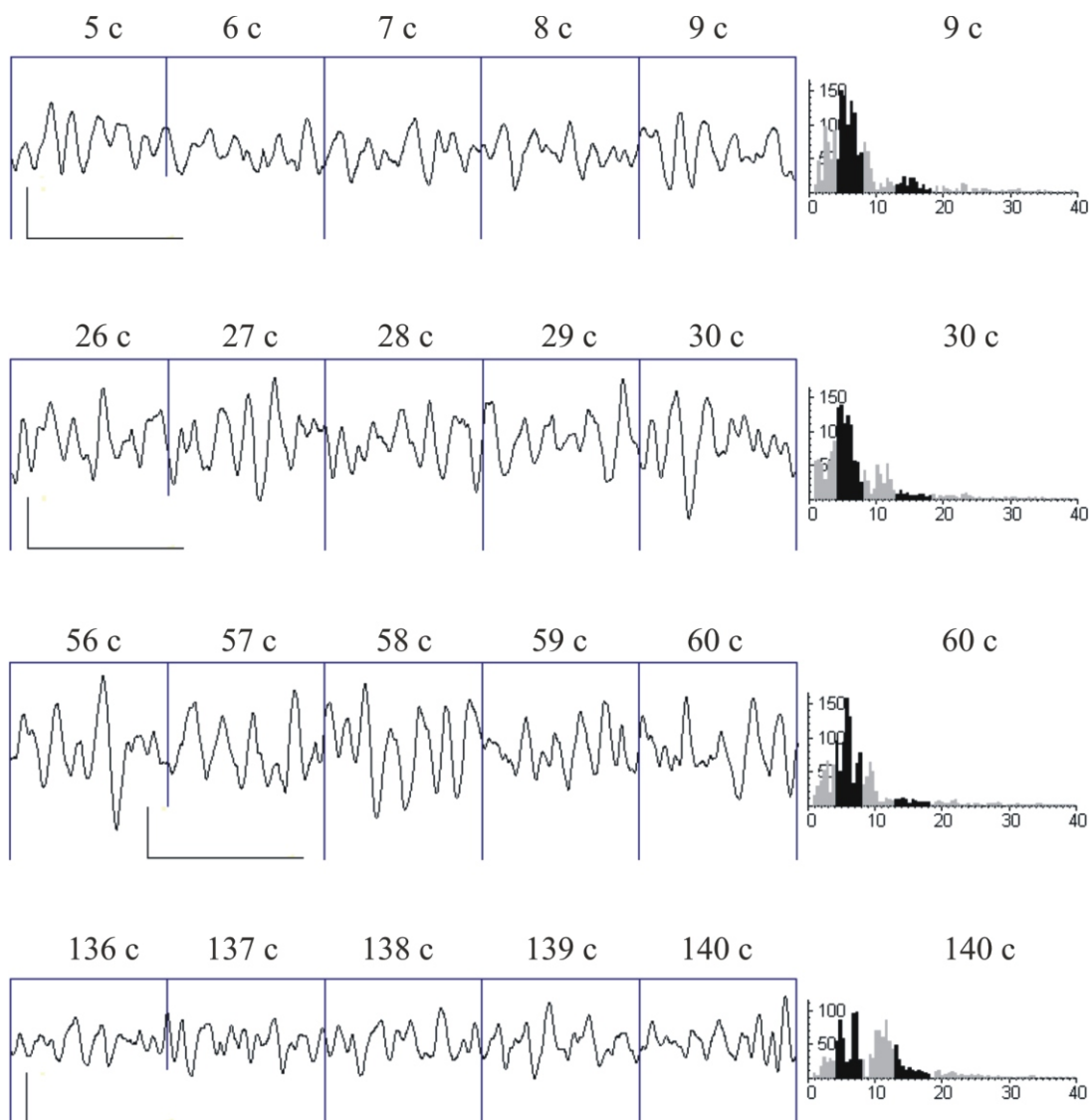


Рис. 2. Пятисекундные отрезки ЭКГ и спектрограммы односекундных отрезков ЭКГ собаки с ишемией миокарда на 1–3-й мин ФЖ. Калибровка ЭКГ: 0,7 мВ, 1 с. На спектрограммах: по оси абсцисс — частота осцилляций, Гц; по оси ординат — амплитуда осцилляций, мкВ; серым цветом выделены частоты 1–3, 8–12 и 18–40 Гц, черным цветом — частоты 4–7 и 13–17 Гц.

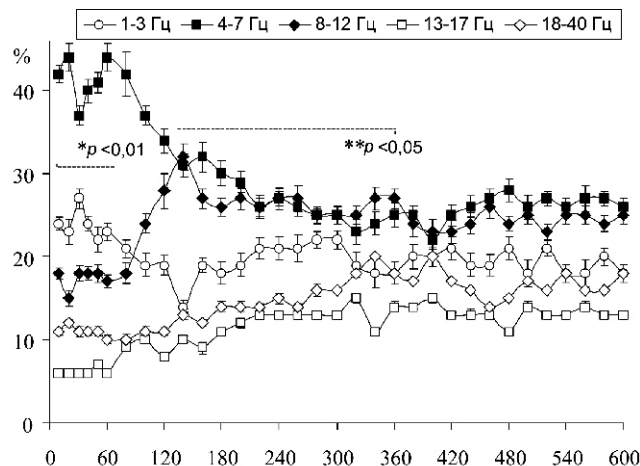


Рис. 3. Удельный вес осцилляций разных частот на 1–10-й мин ФЖ у собак с ишемией миокарда. По оси абсцисс – интервал, с; по оси ординат – удельный вес, %. М ± m; n = 20; * – сравнение 4–7 Гц с другими частотами; ** – сравнение 4–7 и 8–12 Гц с другими частотами. Суммарная амплитуда осцилляций частотой 1–40 Гц составляет 100%.

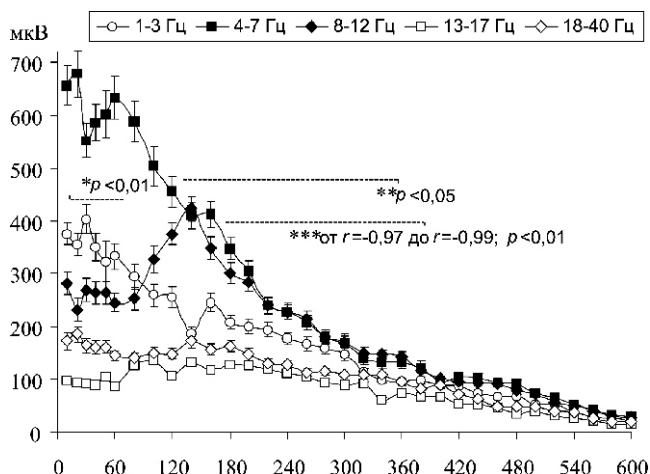


Рис. 4. Амплитуда осцилляций разных частот на 1–10-й мин ФЖ у собак с ишемией миокарда. По оси абсцисс – интервал, с; по оси ординат – амплитуда, мВ. М ± m; n = 20; * – сравнение 4–7 Гц с другими частотами; ** – сравнение 4–7 и 8–12 Гц с другими частотами; *** – корреляционная связь между длительностью ФЖ и амплитудой осцилляций разных частот.

приводила к полной электрической дезорганизации. В противном случае доминантная структура ФЖ была бы невозможна. Расширение диапазона доминирующих осцилляций от 4–7 до 4–12 Гц характеризует снижение организованной активности на 2-й — 3-й мин ФЖ. Но сохранение доминирования осцилляций низких и средних частот при одновременном монотонном снижении амплитуды осцилляций всех 5 частотных диапазонов свидетельствует, по-видимому, о том, что угнетение электрической активности миокарда под влиянием ишемии происходит можно сказать «в организованном порядке» на 4-й — 10-й мин ФЖ. Снижение амплитуды осцилляций следует, по-видимому, объяснить частичной деполяризацией кардиомиоцитов, развивающейся после 2–3 мин ишемии миокарда. Известно, что деполяризация клеток вызывает инактивацию быстрых натриевых каналов и приводит к угнетению скорости нарастания потенциала действия и снижение его амплитуды [18].

Таким образом, в нашей работе впервые показано, что организованная структура ФЖ у собак с ишемией миокарда сохранялась в 10-минутном интервале ФЖ, несмотря на воздействие ишемии на миокард при ФЖ. По-видимому, стадия ФЖ с доминированием осцилляций низких частот (эта стадия определялась нами на 1-й — 2-й мин ФЖ у собак с ишемией миокарда) может иметь важное практическое значение. Известно, что у больных с ишемической болезнью сердца на первых секундах ФЖ, спонтанной или вызванной стимуляцией сердца переменным током 50 Гц, в частотной структуре ЭКГ доминировали осцилляции частотой 4–5 Гц [19, 20]. У больных

с ишемической кардиопатией на начальной стадии ФЖ в частотной структуре ЭКГ доминировали осцилляции частотой 4–6 Гц [21]. При проведении кардиохирургической операции у больных с ишемической болезнью сердца на 20-й — 40-й секундах ФЖ, вызванной стимуляцией сердца стимулами частотой 50 Гц, в частотной структуре ЭКГ доминировали осцилляции 5 Гц [22]. Поэтому результаты нашей работы могут быть использованы для создания алгоритмов автоматической диагностики ФЖ, что будет способствовать сохранению жизни и здоровья людей при жизнеугрожающей ФЖ.

References

1. Bockeria L.A., Bockeria O.L., Kisliitsina O.N. Randomized clinical trials for prevention of sudden cardiac death: principles and total score. *Annaly aritmologii*. 2010; 2: 5-14. (in Russian)
2. Vostrikov V.A. Prehospital electrical defibrillation in sudden cardiac arrest. *Obshchaya reanimatologiya*. 2005; 3: 41-5. (in Russian)
3. Myerburg R.J., Castellanos A. *Cardiac arrest and sudden cardiac death. Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Ed. E. Braunwald. 7-th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2004: 742-960.
4. Abhilash S.P., Narayanan N. Sudden cardiac death. Historical perspectives. *Ind. Heart J*. 2014; 66: S4-9.
5. Huang J., Rogers J.M., Killingsworth C.R., Singh K.P., Smith W.M., Ideker R.E. Evolution of activation patterns during long duration ventricular fibrillation in dogs. *Am. J. Physiol*. 2004; 286: H1193-1200.
6. Huizar J.F., Warren M.D., Shvedko A.G., Kalifa J., Moreno J., Mironov S. et al. Three distinct phases of VF during global ischemia in the isolated blood-perfused pig heart. *Am. J. Physiol*. 2007; 293: H1617-1628.

7. Cheng K.A., Dossdall D.J., Li L., Rogers J.M., Ideker R.E., Huang J. Evolution of activation patterns during long-duration ventricular fibrillation in pigs. *Am. J. Physiol.* 2012; 302: H992-1002.
8. Sawhney N., Narayan S.M. Sudden cardiac arrest in patients with preserved left ventricular systolic function: a clinical dilemma. *Heart Rhythm.* 2009; 6 (Suppl. 3): S15-21.
9. Myerburg R.J., Junttila M.J. Sudden cardiac death caused by coronary heart disease. *Circulation.* 2012; 125: 1043-52.
10. Li L., Jin Q., Dossdall D.J., Huang J., Pogwizd S.M., Ideker R.E. Activation becomes highly organized during long-duration ventricular fibrillation in canine hearts. *Am. J. Physiol.* 2010; 298: H2046-53.
11. Amann A., Tratnig R., Unterkofler K. Reliability of old and new ventricular fibrillation detection algorithms for automated external defibrillators. *BioMedical Engineering OnLine.* 2005. www.biomedical-engineering-online.com/content/4/1/60.
12. Zaitsev A.V., Guha P.K., Sarmast F., Kolli A., Berenfeld O., Pertsov A.M. et al. Wavebreak formation during ventricular fibrillation in the isolated, regionally ischemic pig heart. *Circ. Res.* 2003; 92: 546-53.
13. Gurvich N.L. *The main principles of cardiac defibrillation. [Osnovnye principy defibrilljatsii serdtsa].* Moscow: Meditsina; 1975. (in Russian)
14. Orlov V.N. *Manual of electrocardiography. [Rukovodstvo po elektrokardiografii].* 7-th ed. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2012. (in Russian)
15. Hellyer P., Muir W.W., Hubbell J.A., Sally J. Cardio-respiratory effects of the intravenous administration of tiletamine-zolazepam to dogs. *Vet. Surg.* 1989; 18: 160-5.
16. Akiyama T. Intracellular recording of in situ ventricular cells during ventricular fibrillation. *Am. J. Physiol.* 1981; 240: H465-71.
17. Caldwell J.C., Burton F.L., Cobbe S.M., Smith G.L. Amplitude changes during ventricular fibrillation: a mechanistic insight. *Front. Physiol.* 2012; 3. doi: 10.3389/fphys.2012.00147.
18. Kleber A.G., Rudy Y. Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiol. Rev.* 2004; 84: 431-88.
19. Munoz S.J.J., Alvarez R.J.L., Alberola G.A. Everss E., Alonso-Atienza F., Ortiz M. et al. Spectral analysis of intracardiac electrograms during induced and spontaneous ventricular fibrillation in humans. *Europace.* 2009; 11: 328-31.
20. Panfilov I., Lever N.A., Smaill B.H., Larsen P.D. Ventricular fibrillation frequency from implanted cardioverter defibrillator devices. *Europace.* 2009; 11: 1052-56.
21. Masse S., Farid T., Dorian P., Umaphy K., Nair K., Asta J. et al. Effect of global ischemia and reperfusion during ventricular fibrillation in myopathic human hearts. *Am. J. Physiol.* 2009; 297: H1984-91.
22. Nash M.P., Mourad A., Clayton R.H., Sutton P.M., Bradley C.P., Hayward M. et al. Evidence for multiple mechanisms in human ventricular fibrillation. *Circulation.* 2006; 114: 536-42.

© Коллектив авторов, 2016
УДК 611.08:611:611.12+611.16

Заднипряный И.В., Третьякова О.С., Сатаева Т.П.

Кардиоцитопротекторный эффект цитофлавина в условиях экспериментальной перинатальной гемической гипоксии

Медицинская академия им. С.И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», Республика Крым, 295006, г.Симферополь, бульвар Ленина, д. 5/7

Цель исследования: изучить кардиоцитопротекторный эффект цитофлавина в условиях перинатальной гипоксии в эксперименте. **Методика.** В ходе исследования использовано потомство (22 крысенка) 15 самок белых крыс Вистар в возрасте 3—4 мес. Гемическую гипоксию средней тяжести воспроизводили ежедневным внутривнутрибрюшинным введением всем самкам гипоксанта — нитрита натрия (NaNO_2) в дозе 5 мг/100 г массы тела. Самкам 1-й группы, а также их потомству медикаментозная коррекция не проводилась. Самкам 2-й группы (8 самок) после введения нитрита натрия внутривнутрибрюшинно вводили препарат «Цитофлавин». Для оценки последствий перинатальной гипоксии крысят декапитировали под эфирной анестезией на 7-е сут. после рождения. Исследование миокарда крысят проведено с применением гистологических, ультраструктурных и морфометрических методов. **Результаты.** Выявлено, что гемическая гипоксия, индуцированная нитросоединениями, оказывает выраженное повреждающее действие на сократительные кардиомиоциты новорожденных крысят, которое проявляется в виде гипоксических и ишемических изменений, обусловленных, прежде всего, нарушением целостности клеточных и митохондриальных мембран, вызывает формирование гипоксического типа метаболизма в сердечной мышце, нарушение энергетического обмена в ней, что нашло отражение в нарушении автоматизма миокарда подопытных животных. Применение препарата Цитофлавин у беременных самок позволяет снизить степень повреждения кардиомиоцитов у новорожденных животных, в первую очередь, за счет его мембранопротекторных свойств. **Заключение.** Мембранопротекторные свойства препарата наряду с его антигипоксическим и антиоксидантным эффектами ставят «Цитофлавин» в ряд перспективных средств с кардиоцитопротекторным действием, приводящим к оптимизации энергетического обмена ишемизированного миокарда и позволяет ему занять достойное место в ряду современных препаратов, используемых для коррекции нарушений энергетического обмена в ишемизированном миокарде, в том числе и в неонатальном периоде.

Ключевые слова: гипоксия, миокард, новорожденные, крысы, нитрит натрия, цитофлавин.

Для цитирования: Заднипряный И.В., Третьякова О.С., Сатаева Т.П. Кардиоцитопротекторный эффект цитофлавина в условиях экспериментальной перинатальной гемической гипоксии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 64—71.

Для корреспонденции: Сатаева Татьяна Павловна, канд. мед. наук, доцент каф. биологии медицинской, e-mail: tanzcool@online.ua

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.08.2016

Zadniptyanyy I.V., Tretiakova O.S., Sataieva T.P.

Cardio- and cytoprotective effect of cytoflavin in terms of experimental perinatal hemic hypoxia

Medical Academy named after S.I. Georgievskiy, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Crimean Federal University named after V.I. Vernadsky», Crimea, 295006, Simferopol, Lenin Boulevard, 5/7

The purpose of research is to study cardiocytoprotective effect of cytoflavin in terms of a perinatal hypoxia in experiment. **Methods.** During research the offspring (22 pups) of 15 females of white Wistar line rats aged 3-4 months were involved. The hypoxia was recreated by daily intraperitoneal introduction of sodium nitrite (NaNO_2) in a dose of 5 mg/100 g of the body weight causing a moderately severe hypoxia. To females of the first group, and also their posterity medicamentous correction wasn't carried out. To females of the second group (8 females) after administration of sodium nitrite Cytoflavin was injected intraperitoneally. For an assessment of consequences of a perinatal hypoxia pups aged 7 days were slaughtered by means of a fast decapitation under ethereal anesthesia. **Results.** It is taped that the hypoxia induced by nitro bonds has the expressed damaging effect on cardiomyocytes of newborn infant rats which is shown in the form of the hypoxemic and ischemic changes caused, first of all, by disturbance of integrity of cellular and mitochondrial membranes causes formation of

hypoxemic type of a metabolism in a cardiac muscle, disturbance of energy balance in it found reflection in disturbance of automatism of a myocardium of experimental animals. Cytoflavin at pregnant females in experiment allows to lower a damage rate of cardiomyocytes at newborn animals, first of all, at the expense of his protective properties. **Conclusion.** Membrane-protective properties of the drug along with its anti-hypoxic and antioxidant effects can put Cytoflavin in a number of promising drugs with cardiological and cytological protective action, leading to the optimization of energy metabolism in ischemic myocardium and allows it to take its rightful place among the modern drugs which are used to correct disorders of energy metabolism in the ischemic myocardium including pathologies in the neonatal period.

Keywords: hypoxia; myocardium; newborns; rats; sodium nitrite; cytoflavin.

For citation: Zadnipyryany I.V., Tretiakova O.S., Sataieva T.P. Cardio- and cytoprotective effect of cytoflavin in terms of experimental perinatal hemic hypoxia *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (4): 64–71. (in Russ).

For correspondence: Sataieva Tatiana Pavlovna, PhD, assistant professor of Medical biology department of Medical Academy named after S.I. Georgievskiy «Crimean Federal University named after V.I. Vernadsky», Crimea, 295006, Simferopol, Lenin Boulevard, 5/7, e-mail: tanzcool@online.ua

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Zadnipyryany I.V., <http://orcid.org/0000-0002-8181-9709>

Tretiakova O.S., <http://orcid.org/0000-0002-2476-0624>

Sataieva T.P., <http://orcid.org/0000-0001-6451-7285>

Введение

Гипоксия плода приводит к нарушению функции жизненно важных систем организма, и прежде всего, головного мозга, сердца, почек [1–5]. Общеизвестно, что дальнейшее качество жизни как новорожденных, так и детей более старшего возраста во многом зависит от тяжести перинатальных осложнений, возникающих в первые часы и дни их жизни [1, 2]. В связи с этим, предотвращение и своевременная коррекция этих нарушений является чрезвычайно актуальной задачей [5, 6]. Одним из последствий гипоксии в период беременности является формирование у новорожденных гипоксической ишемии миокарда, что клинически проявляется транзиторной депрессией сократимости, дисритмией, а в тяжелых случаях — проявлениями сердечной недостаточности [2, 7]. Традиционно ишемия рассматривается как дисбаланс между доставкой оксигенированной крови к миокарду и его потребностью в кислороде. Известно, что сердечная мышца имеет свою «топливную экономику», чутко реагирующую на широкий спектр изменений ее окружения [8]. Несоответствие доставки кислорода потребностям клеток влечет за собой существенное изменение метаболизма кардиомиоцитов. Как известно, сердце «метаболически всеядно» и способно извлекать энергию из окисления свободных жирных кислот, глюкозы, лактата и других окисленных продуктов [8–10]. Следствием активации гликолиза является накопление лактата, разобщение окислительного фосфорилирования, развитие лактоацидоза и перегрузка кардиомиоцитов ионами кальция. В свою очередь, лактоацидоз активирует фосфо-

липазу A_2 , вызывающую повреждение мембранных структур и иницирование процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [11]. Результатом этого является формирование гипоксического типа метаболизма, приводящего к нарушению энергетического обмена, что, в конечном итоге, индуцирует снижение сократительной способности миокарда [8, 10].

В последние десятилетия на фармакологическом рынке появился новый класс препаратов — регуляторов энергетического обмена, способных оптимизировать процессы энергообеспечения в ишемизированном органе [8, 9, 11–17]. В основе антиишемического действия препаратов этой группы лежит их способность устранять гипоксический тип метаболизма даже в условиях выраженного дефицита кислорода, благодаря устранению ингибирования сукцинатдегидрогеназы и восстановлению активности быстрого метаболического кластера митохондрий. В результате их применения возрастает утилизация жиров, подавляется гликолиз и образование лактата, устраняется разобщение окислительного фосфорилирования, лактоацидоз, нормализуется концентрация ионизированного Ca^{2+} в клетке и минимизируется активация процессов ПОЛ [8, 9]. К числу таких препаратов следует отнести препарат «Цитофлавин» (НПЦ «Полисан», Санкт-Петербург), имеющий соответствующую доказательную базу, метаболическая энергокоррекция, антигипоксическая и антиоксидантная активность которого обусловлены взаимодополняющим действием важнейших компонентов цикла Кребса: двух метаболитов (янтарной кислоты, инозина) и двух витаминов (никотинамида и рибофлавина) [7, 11–17].

Цель исследования — изучение кардиоцитопротекторного эффекта цитофлавина в условиях перинатальной гипоксии в эксперименте.

Методика

В ходе исследования использовалось потомство (22 крысенок) 15 самок белых крыс Вистар массой 200—250 г, в возрасте 3—4 мес. Для исключения реакции на новизну обстановки перед началом эксперимента их в течение 10 сут. выдерживали в стационарных условиях вивария. При подборе самок определялась фаза эстрального цикла. Животных включали в эксперимент в период диэструса. Для индукции беременности к одному самцу подсаживалось 4 самки. Факт беременности устанавливался при выявлении во влагалищном мазке сперматозоидов и последующему установившемуся периоду межтечки [11]. Крысы содержались в виварии с естественным освещением при температуре 20—22°C в клетках площадью 0,6 м², не более 4 самок в каждой клетке. За три дня до предполагаемых родов самки помещались в индивидуальные клетки.

Гемическую гипоксию воспроизводили ежедневным (на протяжении всей беременности и в течение первых 7 сут. периода молочного вскармливания) внутрибрюшинным введением всем самкам гипоксанта — нитрита натрия (NaNO₂) в дозе 5 мг/100 г массы тела, вызывающего гемическую (анемическую) сублетальную гипоксию средней степени тяжести [19].

Самкам 1-й группы (n = 7), а также их потомству (10 крысятам) медикаментозная коррекция не проводилась. Самкам 2-й группы (8 самок, 15 крысят) после введения нитрита натрия внутрибрюшинно вводили «Цитофлавин» из расчета 0,5 мл/100 г массы тела животного. Контрольную группу составили 6 новорожденных крысят от 4 интактных животных. Эксперименты проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР № 742 от 13.11.84 г., закон «О защите животных от жестокого обращения» гл. V, ст. 10 4679-ГД от 01.12.1999). Для оценки последствий перинатальной гипоксии крысят декапировали под эфирной анестезией на 7-е сут. после рождения (согласно классификации, период жизни у этой категории животных с 1 по 7-е сут. после рождения именуется периодом новорожденности) [18].

Исследовали миокард правого и левого желудочков. Срезы миокарда окрашивали гематоксилином и эозином, ГОФП-методом (гематоксиллин-основной фуксин-пикриновая кислота) с целью выявления очагов ишемического повреждения по Lie. Выявление белка соединительной ткани — виментина (клон V9, Dako) проводили с помощью иммуногистохимическо-

го (двойного пероксидаза-антипероксидазного) метода с использованием иммуногистостейнера «Dako Autostainer» («Dako Cytomation», Дания).

Подготовка материала для ультрамикроскопического исследования осуществляли по стандартной методике. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме УМТП-7 (Украина), окрашивали толуидиновым синим, контрастировали цитратом свинца и уранилацетатом по Пирсу. Для оценки проницаемости клеточных мембран применялась методика контрастирования гидроокисью лантана по Овертону. Просмотр и фотографирование выполнялись на световом (Olympus CX-1, Япония) и электронном (ПЭМ-125 Selmi, Украина) микроскопах при ускоряющем напряжении 125 кВ.

Для оценки функционального состояния миокарда до момента забоя проводилась регистрация ЭКГ при помощи игольчатых электродов на портативном компьютерном комплексе Cardioperfect.

Морфометрические измерения производили при увеличении 400^x с помощью лицензионной программы Image J. Статистическую обработку проводили в программе Statistica 6.0 с вычислением t-критерия Стьюдента с определением вероятности различия «p» по таблице Фишера—Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Доказано, что миокард новорожденного имеет определенные морфофункциональные особенности: относительное уменьшение количества миофибрилл со снижением функции кальциевых каналов; уменьшение количества митохондрий, понижение активности ферментов митохондрий, участвующих в метаболизме свободных жирных кислот (карнитиновая недостаточность) [12]. В свою очередь, как известно, увеличение объема стромы сердца с низким содержанием эластических волокон является предпосылками быстрого развития дезадаптивного ремоделирования сердца [6, 12]. Именно поэтому отрицательные воздействия, так называемых «средовых факторов» в период внутриутробного развития оставляют структурный след во всех органах и системах.

У новорожденных животных, которым моделировали гипоксию без коррекции (1-я группа), наблюдается снижение массы тела с $15,11 \pm 0,31$ г (масса сердца в группе контроля) до $11,36 \pm 0,05$ г, что было статистически значимо (ниже нормы на 33,01%). У крысят, рожденных от самок крыс, получавших в качестве кардиопротектора «Цитофлавин», масса тела составила $12,84 \pm 0,27$ г, что было на 17,67% ($p \leq 0,05$) ниже контроля, но тем не менее было значимо выше соответствующих показателей без коррекции (на 15,32%).

Морфологическое исследование миокарда крысят 1-й группы выявило признаки прогрессирующего ишемического процесса в сердце, что совпадает с данными литературы [8]. Морфологические проявления у животных этой группы характеризовались, в первую очередь, неравномерно выраженным периваскулярным отёком. Помимо этого, выявлялись участки тканей, имеющие морфологические признаки дистрофии и некроза, что проявлялось отсутствием поперечной исчерченности, гомогенизацией цитоплазмы, или появлением в ней значительных размеров просветлений, свидетельствующих о деструктивных процессах (рис. 1, а).

При окраске гематоксилин-эозином в группе без применения протектора морфометрически выявлено статистически значимое уменьшение длины и площади кардиомиоцитов соответственно на 31,25% и 20,11% по сравнению с контролем, что свидетельствует об их как гипоксическом, так и ишемическом повреждении (таблица).

В то же время в периваскулярном пространстве у крысят определялись утолщенные прослойки виментина — белка соединительной ткани мезодермального происхождения, который, вероятно, замещал утраченные кардиомиоциты. Известно, что подобные процессы фиброгенеза приводят к затруднению транспорта питательных субстратов и кислорода к рабочим клеткам, что, безусловно, еще более усугубляет ишемические и гипоксические изменения сократительного аппарата кардиомиоцитов в условиях гемической гипоксии (рис. 1, б). В этих же участках отмечается выраженная фуксинофилия, что подтверждает развитие ишемии кардиомиоцитов и массивного интерстициального отека (рис. 1, в).

Об ухудшении сократительной функции кардиомиоцитов опосредованно можно судить по наличию признаков расстройств кровообращения, проявлявшихся в виде полнокровия сосудов как капиллярного русла, так и сосудов более крупного калибра, а также появлению мелких кровоизлияний.

На ультраструктурном уровне миокард новорожденных крыс в норме представлен преимущественно сократительными кардиомиоцитами и компонентами

гемомикроциркуляторного русла [20—22]. При исследовании ультраструктуры сердечной мышцы подопытных животных 1-й группы были выявлены округлые неоднородные по размерам клетки сократительного миокарда, окруженные многочисленными кардиомиоцитами с признаками дистрофии. О развитии дистрофии миокарда свидетельствуют и другие морфологические проявления в виде снижения количества гранул гликогена, конденсации рибонуклеопротеидов вблизи кариолеммы, и значительного просветления нуклеоплазмы. Ряд сократительных кардиомиоцитов имел признаки необратимых деструктивных процессов: повреждение сарколеммы, фрагментация ядер по типу апоптоза, разрушением мембран митохондрий с тотальным и субтотальным лизисом крист. Отмечалось появление электронноплотных включений в цитоплазме клеток, что является свидетельством отложений в ней липидов и ионов кальция. Все эти процессы развивались на фоне выраженного внутриклеточного отека, о чем свидетельствует появление остроконечных инвагинатов кариолеммы, что, как известно, является патогномичным признаком развития отека клетки, вызванного нарушением проницаемости сарколеммы (рис. 1, г) [20]. О тяжести процесса, его необратимости свидетельствует также выявление контрактурных изменений кардиомиоцитов в виде ригорных комплексов (полос пересокращения миофибрилярного аппарата) (рис. 1, д). Расширение цистерн саркоплазматической сети, литические повреждения митохондрий, сопровождающиеся накоплением в них электронноплотных включений, явились следствием необратимых нарушений проницаемости сарколеммы, свидетельством чего явилось обнаружение частиц коллоидного лантана во внутримитохондриальном пространстве.

Морфологические изменения миокарда нашли свое отражение в нарушении автоматизма сердца, что проявлялось в виде номотопных и гетеротопных дизритмий: так, при регистрации ЭКГ у новорожденных крысят 1-й группы наряду с брадикардией (менее 330 уд./мин) у некоторых, были выявлены «залпы» суправентрикулярной экстрасистолии на фоне выраженной брадикардии (рис. 1, е).

Таблица

Морфометрические показатели миокарда новорожденных крысят, $X \pm S_x$

Показатель	Контроль (норма) (n = 6)	Введение NaNO ₂ (n = 10)	Введение NaNO ₂ + Цитофлавин (n = 15)
Длина кардиомиоцитов, мкм	54,13 ± 3,15	41,24 ± 2,61*	46,12 ± 3,29*
Площадь кардиомиоцитов, мкм ²	324,36 ± 24,53	270,03 ± 20,14*	284,52 ± 6,11*
Диаметр ядер кардиомиоцитов, мкм	4,12 ± 0,31	3,89 ± 0,16	3,99 ± 0,17
Площадь ядер кардиомиоцитов, мкм ²	18,31 ± 2,18	15,45 ± 3,16	16,43 ± 0,16
Примечание. * — p ≤ 0,05 по сравнению с контролем.			

В то же время введение препарата «Цитофлавин» беременным самкам оказывало существенное позитивное влияние на морфологическую картину ишемизированного миокарда новорожденных крысят, что проявлялось в виде снижения степени повреждения кардиомиоцитов: клетки сердца сохраняли поперечную исчерченность, в них отсутствовали признаки глубокой дистрофии, необратимой деструкции и выраженного интерстициального отека (рис. 2, а). Изменения со стороны сосудов в таких участках сводились к чередованию нерезко выраженного полнокровия и спазма сосудов гемомикроциркуляторного русла.

При морфометрии выявлено статистически значимое уменьшение длины и площади кардиомиоцитов по сравнению с контролем (на 14,79% и 12,28% соответственно), что превышало аналогичные показатели в 1-й группе без применения протектора на 20,46% и 7,38% соответственно, что свидетельствует о цитопротекторном эффекте «Цитофлавина» (таблица). Тонкие и умеренно выраженные виментиновые структуры экспрессировались в основном периваскулярно, что можно расценивать как отражение компенсаторных процессов (рис. 2, б). Цитоплазма большинства

кардиомиоцитов имела желто-зеленое окрашивание с мелкими диффузными фуксинофильными включениями, что свидетельствует об уменьшении тяжести ишемии (рис. 2, в). Полученные в ходе исследования данные совпадают с результатами других авторов [12].

На ультраструктурном уровне у крысят 2-й группы в кардиомиоцитах выявлялись признаки повреждений преимущественно обратимого характера. Эти изменения заключались в неравномерном распределении нуклеарного хроматина, очаговом лизисе крист митохондрий, причем большинство митохондрий сохраняли свою нормальную структуру и не содержали электронноплотных включений, что свидетельствовало о сохранности их мембран. Подтверждением нормализации проницаемости как непосредственно клеточных, так и внутриклеточных мембран явилось отсутствие частиц коллоидного лантана во внутриклеточном и внутримитохондриальном пространстве. В то же время наряду с интактными гетерогенными органеллами, в этих же кардиомиоцитах встречались крупные митохондрии с лизированными кристами. Некоторые сократительные кардиомиоциты имели крупные ядра округлой формы с ядрышками, сни-

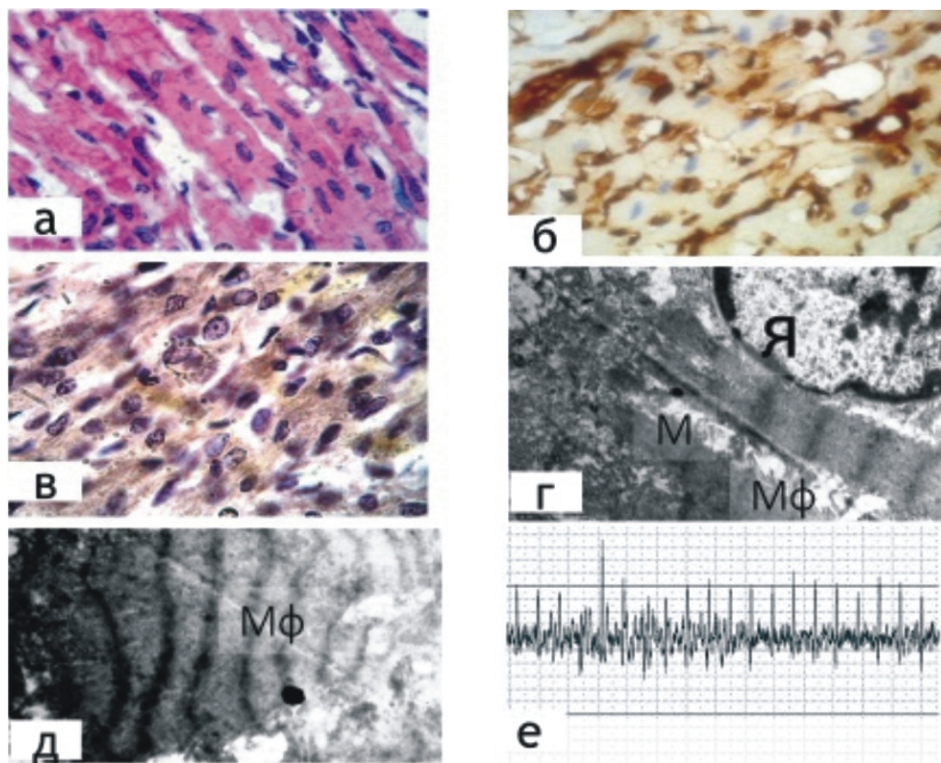


Рис. 1. Изменения миокарда новорожденных крысят, перенесших перинатальную гемическую гипоксию. а — признаки смешанной дистрофии кардиомиоцитов, миокард имеет «ячеистый» вид за счет выраженного отека и гибели кардиомиоцитов. Окраска гематоксилином и эозином, x400; б — повышенная экспрессия виментина в интерстиции. Иммунопозитивное окрашивание Envision. x1000; в — выраженная фуксинофилия цитоплазмы кардиомиоцитов в сочетании с резким интерстициальным отеком. Окраска ГОФП-методом. x1000; г — неравномерная конденсация хроматина, формирование остроконечных инвагинатов ядра (Я), деструкция митохондриальных крист (М) и миофибрилл (Мф). ТЭМ. x16000; д — ригорные комплексы (Мф). ТЭМ. x18000; е — extrasystolia на фоне брадикардии.

женное количество миофибрилл и большое количество близко расположенных гетерогенных митохондрий с плотноупакованными кристами, что является отражением компенсаторных процессов (рис. 2, г). В миокарде животных этой группы отсутствовали ригорные комплексы, что свидетельствует об обратимости процессов, происходящих в миокарде.

Профилактическое введение самкам цитофлавина устраняло гетеротопные нарушения ритма у их потомства: несмотря на наличие брадикардии (350—450 уд./мин), в данной группе случаев экстрасистолии не было зарегистрировано.

Таким образом, в сердце новорожденных крысят в условиях перинатальной гипоксии развиваются обратимые, а в тяжелых случаях, — необратимые изменения кардиомиоцитов, что является отражением не только гипоксического повреждения сердечной мышцы, но и свидетельством развития ишемических процессов в миокарде [9, 12, 20—22].

В то же время применение регулятора энергетического обмена цитофлавина привело к ликвидации дисметаболизма миокарда, о чем опосредованно можно судить по стабилизации проницаемости клеточных

мембран, вероятно, за счет защиты кальциевых каналов от действия продуктов ПОЛ, что нашло отражение и на ультраструктурном уровне в виде отсутствия признаков необратимых изменений миокарда с большей сохранностью, по сравнению с животными 1-й группы, мембран кардиомиоцитов, их органелл (прежде всего митохондрий), отсутствия электронноплотных включений, нормализации структуры миофибрилл и других морфологических изменений.

Полученные в ходе исследования результаты согласуются с данными литературы, свидетельствующими о способности цитофлавина оказывать антигипоксический, антиоксидантный эффекты [11, 12, 16, 17]. Так, использование цитофлавина в группе животных с экспериментальной ишемией миокарда привело к положительным метаболическим эффектам в виде активации ферментного звена антиоксидантной системы при одновременном снижении содержания промежуточных продуктов липопероксидации [14, 17].

Эти эффекты цитофлавина обусловлены прежде всего потенцирующим действием его составляющих: янтарной кислоты, рибофлавина (витамина В₂), никотинамида (витамина РР), рибоксина (Инозина)

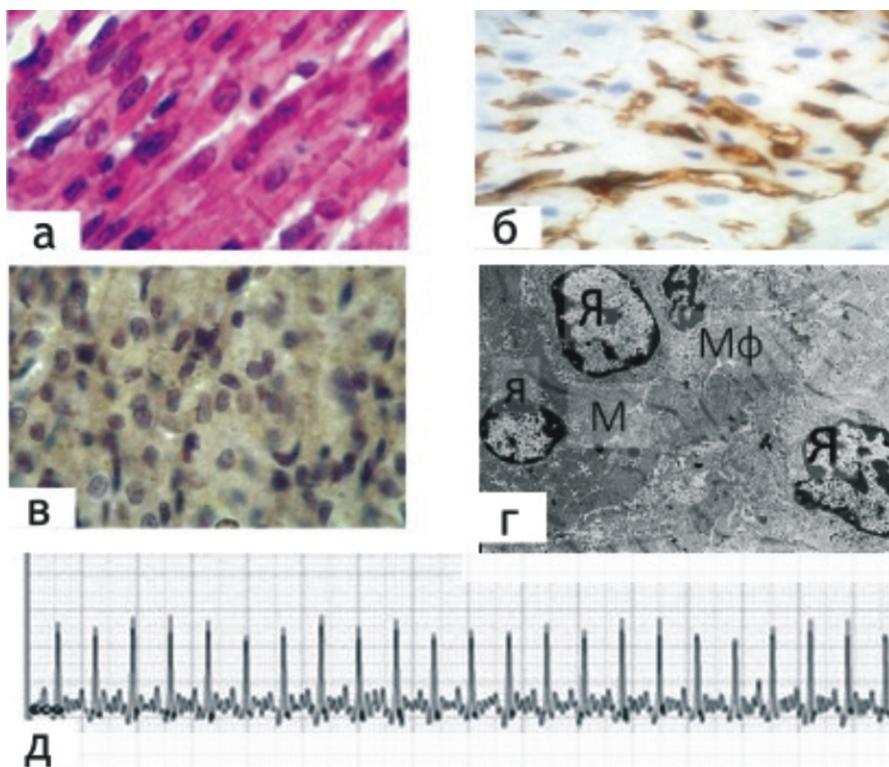


Рис. 2. Морфологические изменения миокарда новорожденных крысят при введении цитофлавина.

а — умеренно выраженный интерстициальный отек миокарда. Окраска гематоксилином и эозином x400; б — умеренная экспрессия виментина в интерстициальном пространстве. Иммунопозитивное окрашивание Envision. x1000; в — умеренная фуксинофилия цитоплазмы кардиомиоцитов. Окраска ГОФП-методом. x400; г — ядра кардиомиоцитов округлой формы с сохранением неравномерной конденсации хроматина (Я), появление гетерогенных митохондрий с плотно упакованными митохондриальными кристами (М). ТЭМ. x10 000; д — ЭКГ: умеренная брадикардия (410 уд./мин) у новорожденных крысят 2-й группы.

[14, 16]. Янтарная кислота в сочетании с коферментами цикла Кребса не только улучшает тканевое дыхание за счет активации транспорта электронов в митохондриях, но и подавляет ПОЛ, повышает активность супероксиддисмутазы, улучшая структуру и функцию мембраны клеток [13, 16]. Кроме того, компоненты препарата усиливают компенсаторную активацию аэробного гликолиза и активируют энергосинтезирующую функцию митохондрий, необходимую для поддержания нормальной работы миокарда [8].

Эти эффекты изучаемого препарата «Цитофлавин» нашли свое отражение в минимизации изменений миокарда новорожденных крысят, матери которых во время беременности получали соответствующую терапию. Это коррелирует с результатами клинических наблюдений, в частности, многоцентрового исследования клинической эффективности цитофлавина у 30 новорожденных детей с постгипоксическим повреждением миокарда на фоне церебральной ишемии I — II степени [7]. В ходе этого исследования было установлено, что наряду с улучшением общего состояния, у пациентов в более короткие сроки по сравнению с контролем происходила ликвидация гипоксии и электрической нестабильности миокарда, изменений реполяризации. Снижался энергетический дефицит, регистрировалась положительная динамика насосной и сократительной функции миокарда как в период терапии в стационаре, так и при катамнестическом наблюдении в течение первых 6 мес. жизни младенцев.

И это весьма значимо, имеет практическое значение, так как перечень парентеральных препаратов, обладающих кардиоцитопротекторным эффектом в неонатологии, крайне ограничен. А, как известно, в современной неонатальной практике 80—90% препаратов назначаются по принципу off label, т.е. без проведения клинических испытаний — путем экстраполяции данных, полученных при их исследовании в том числе и во «взрослой популяции» [16].

Выводы

1. Гемическая гипоксия, индуцированная нитросоединениями, оказывает выраженное повреждающее действие на сократительные кардиомиоциты новорожденных крысят, которое проявляется в виде гипоксических и ишемических изменений, обусловленных, прежде всего, нарушением целостности клеточных и митохондриальных мембран, приводит к формированию гипоксического типа метаболизма в сердечной мышце, нарушению энергетического обмена в ней, что нашло отражение в нарушении автоматизма миокарда у подопытных животных.

2. Применение препарата «Цитофлавин» у беременных самок в эксперименте позволяет снизить степень повреждения кардиомиоцитов у новорожденных животных, в первую очередь, за счет его мембранопротекторных свойств, что проявлялось в виде сохранности как мембран самих кардиомиоцитов, так и их оргanelл. Комплексное влияние компонентов препарата способствует минимизации проявлений дистрофии кардиомиоцитов, интерстициального отека, фиброгенеза и нарушений кровообращения, что обеспечивает функциональную сохранность миокарда.

3. Мембранопротекторные свойства препарата наряду с его антигипоксическим и антиоксидантным эффектами ставят «Цитофлавин» в ряд перспективных средств с кардиоцитопротекторным действием, приводящим к оптимизации энергетического обмена ишемизированного миокарда и позволяет ему занять достойное место в ряду современных препаратов, используемых для коррекции нарушения энергетического обмена в ишемизированном миокарде, в том числе и в неонатальном периоде.

References

1. Bokeria E.L. Heart rhythm disturbances at newborn children with hypoxemic and ischemic encephalopathy. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2001; 46(1):19-21. (In Russ.)
2. Kislenco O.A., Kotlukova N.P., Rybalko O.N. Diagnostic value of various markers of myocardial dysfunction at children of chest age with pathology of cardiovascular system. *Pediatriya*. 2011; 5: 6-1. (In Russ.)
3. Tretiakova O.S., Zadnipriyani I.V. Perinatal hypoxia and phenomenon of the «deafened» myocardium of newborns. *Sovremennaya pediatriya*. 2007; 4(17): 177-0. (In Russ.)
4. Adams J.M., Garson A., Bricker J.T., McNamara D.G. *Neonatology. The science and practice of pediatric cardiology*. Philadelphia — London. 2000; 3: 2477-89.
5. Patterson A.J., Zhang L. Hypoxia and fetal heart development. *Curr. Mol. Med.* 2011; 10(7): 653-66.
6. Lebedeva O.V., CHerkasov N.S., CHechukhin V.M. Clinical value of use of a reamberin in prophylaxis of cerebral and cardiovascular complications at newborns with very low and extremely low body weight. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2010; 2: 19-9. (In Russ.)
7. Degtiareva E.A., Romantcov M.G., Mikheeva A.A., Avakian A. Zhdanova O. I. Correction of post-hypoxemic injuries of a myocardium at newborn children with cerebral ischemia. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2010; 73(10): 17-20. (In Russ.)
8. Zhitnikova L.M. Metabolic therapy, or cardiocytopenation — as a necessary component of the combined therapy of cardiovascular diseases. *RMZH*. 2012; 4: 137. (In Russ.)
9. Kukes V.G., Gorbach T.V. Romashchenko O.V. Efficiency of metabolic medicines in case of experimental ischemia of a myocardium. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya* 2015; 5: 86-8. (In Russ.)

10. Trifonova O.Yu., Khazanov V.A. Myocardium ischemia: haemodynamic and metabolic aspects. *Farmatsevticheskiy vestnik*. 2004; 5: 14. (In Russ.)
11. Bizenkova M.N., Chesnokova N.P., Romantcov M.G. Pathogenetic justification of expediency of use of cytoflavinum at ischemic damage of a myocardium. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2005; 1: 20-1. (In Russ.)
12. Bul'on V.V., KHnychenko L.K., Saprionov N.S., Kovalenko A.L., Alekseeva L.E. Cytoflavine correction of ischemic myocardial damage consequences. *Ekspierimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya*. 2002; 65(1): 27-9. (In Russ.)
13. Degtjareva E.A., Kovalenko A.L., Romancov M.G., Rogatkin S.O. Cytoflavin — the first experience of application in children's practice (clinical review on materials of randomized researches). *Rossityskiy pediatricheskiy zhurnal*. 2011; 1: 27-31. (In Russ.)
14. Gorbach T.V., Romashhenko O.V., Rumbesht V.V. Clinical and experimental study of efficiency of a cytoflavin in case of myocardium ischemia. *Vestnik problem biologii i meditsini*. 2013; 2(100): 196-0. (In Russ.)
15. Zarubina I.V., Lukk M.V., Shabanov P.D. Antihypoxic and antioxidant effects of exogenous succinic acid and aminothioli succinate-containing antihypoxants. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012; 153(3): 336-9.
16. Degtjareva E.A., Zhdanova O.I., Miheeva A.A., Avakjan A.A. Some aspects of remedial treatment and primary rehabilitation of children with cerebrocardial syndrome. *Kardiosomatika*. 2011; 1:18-3. (In Russ.)
17. Zadnipyanyy I.V., Tret'yakova O.S., Sataeva T.P. Investigation of the antioxidant activity and cardioprotective effect of reamberin and cytoflavin in newborn rats exposed to chronic hemic hypoxia. *Arkhiv patologii*. 2015; 77(6): 39-4. DOI:10.17116/patol201577639-44. (In Russ.)
18. Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I. *Laboratory animals. [Laboratornie zhivotnie]*. Kiev.: Vishha shkola; 1974. (In Russ.)
19. Cherkesova D.U., Omarov M.-S.A. Experimental model of a pre-natal nitritny hypoxia. *Bjulleten' Dagestanskogo nauchnogo centra RAN. «Medicina. Nauka i praktika»*. 1995; 1:44-46. (In Russ.)
20. Zadnipyanyy I.V., Tret'yakova O.S., Sataeva T.P. Ultrastructure of a myocardium of newborn infant rats in the conditions of a chronic heamic hypoxia. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya Meditsina. Farmacijya*. 2015; 4 (201): 72-6. (In Russ.)
21. Zadnipyanyy I.V., Tret'yakova O.S. Restructuring of a myocardium at a perinatal hypoxia in experimental conditions. *Krymskiy zhurnal eksperimental'noy i klinicheskoy meditsiny*. 2011; 1(1): 40-4.
22. Zadnipyanyy I.V., Sataeva T.P. Neonatal rat myocardium survival in terms of chronic hemic hypoxia. *In the world of scientific discovery*. 2014; 58(10): 281-90.

Сведения об авторах:

Заднипряный Игорь Владимирович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. топографической анатомии и оперативной хирургии, e-mail: zadnipyany@gmail.com

Третьякова Ольга Степановна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. общественного здоровья и здравоохранения

© Коллектив авторов, 2016
УДК 612.323:612.112

Матвеева Л.В., Мосина Л.М.

Взаимосвязь секреторной активности желудка и иммунных изменений периферической крови при ulcerогенезе желудка

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет, Россия, 430005, Республика Мордовия, г.Саранск, ул. Большевистская, д. 68

Заболеемость населения язвенной болезнью желудка высока практически во всех странах мира. На развитие и течение заболевания влияют состояние кислото- и ферментопродукции желудка, иммунного статуса. **Целью работы** явилось определение наличия и силы коррелятивных связей секреторной активности желудка и иммунных изменений периферической крови при обострении язвенной болезни желудка. **Методы.** Обследовали при получении информированного согласия больных (42 человека) язвенной болезнью желудка в фазе обострения до проведения эрадикационной и антисекреторной терапии и 40 здоровых добровольцев. О состоянии кислото- и ферментобразующей функции слизистой оболочки желудка судили по результатам двухчасовой внутрижелудочной рН-метрии и по сывороточной концентрации пепсиногенов, гастрин до начала активного лечения больных. Иммунофенотип лимфоцитов по CD-антигенам (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD45, CD56) определяли иммунофлюоресцентным методом, уровень иммуноглобулинов изотипов M, G, A, E — иммуноферментным методом. **Результаты.** При кратковременной внутрижелудочной рН-метрии гиперацидность желудка у больных регистрировалась в 6,7 раза чаще, чем у здоровых, нормащидность — в 12,3 раза реже. Снижение кислотообразования наблюдалось в 8,6 раза чаще, что указывало на развитие атрофии слизистой оболочки. Базальный рН в антральном отделе был меньше на 54,5%, чем в контрольной группе, при стимуляции увеличивался на 33,6%, но оставался меньше значений здоровых лиц на 48,7%. При иммуноферментном анализе количества пепсиногенов у больных наблюдалось достоверное увеличение сывороточного уровня РС-I относительно контрольной группы на 33,4%, РС-II — на 52%. При оценке иммунного статуса у больных были выявлены изменения в системе фагоцитов, клеточном и гуморальном звеньях, наиболее выраженные при тяжелом течении язвенной болезни. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о наличии положительных и отрицательных коррелятивных связей умеренной и средней силы между показателями секреторной активности СОЖ, врожденного и адаптивного иммунитета у больных с обострением ЯБ желудка. Наличие и характер данных взаимосвязей следует учитывать при назначении антисекреторных препаратов.

Ключевые слова: ulcerогенез; кислотопродукция; пепсиноген; гастрин; лимфоциты; иммуноглобулин.

Для цитирования: Матвеева Л.В., Мосина Л.М. Взаимосвязь секреторной активности желудка и иммунных изменений периферической крови при ulcerогенезе желудка. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 72–78.

Для корреспонденции: Матвеева Любовь Васильевна, канд. мед. наук, доцент каф. иммунологии, микробиологии и вирусологии, e-mail: MatveevaLjubov1@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 30.09.15

Matveeva L.V., Mosina L.M.

Interrelation secretory activity of stomach and immunes changes of peripheral blood when ulcerogenesis stomach

National Research Mordovia State University; 68, Bolshevistskaja st., Saransk, Republic of Mordovia, 430005, Russia

Incidence of gastric ulcer is high in almost all countries of the world. On the development and course of the disease affect the state acid- and enzymes production stomach, immune status. **The purpose** was to determine the presence and power of correlative links secretory activity of the stomach and immune changes in the peripheral blood during exacerbation of ulcer disease stomach. **Methods.** Surveyed in obtaining informed consent 42 patients with gastric ulcer in the acute phase prior to the eradication and antisecretory therapy and 40 healthy volunteers. On the state of function acid- and enzymes production of the gastric mucosa judged by the results of a 2-hour intragastric pH-metry and serum concentration pepsinogen, gastrin before the start of active treatment. Immunophenotype lymphocytes on CD-antigens (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19,

CD45, CD56) was measured by immunofluorescence, levels immunoglobulin isotype M, G, A, E — ELISA method. **Results.** When short-term intragastric pH-metry of the stomach hyperacidity patients recorded 6.7 times more likely than healthy, normacidity — 12.3 times less. Reduction of acid production was observed up to 8.6 times more, indicating the development of mucosal atrophy. Basal pH in the antrum was lower by 54.5% than in the control group, with stimulation increased by 33.6%, but remained lower than the values of healthy individuals by 48.7%. When ELISA amount pepsinogen patients showed significant increase in serum levels of PG-I relative to the control group at 33.4%, PG-II — 52%. In assessing the immune status of patients were identified changes in system phagocytes, cellular and humoral links, most pronounced for severe current peptic ulcer disease. **Conclusion.** The results indicate the presence of positive and negative correlative links mild to moderate force between indicators of secretory activity of gastric mucosal innate and adaptive immunity in patients with acute exacerbation of peptic ulcer disease. The presence and nature of these relationships should be taken into account when appointing antiseptic drugs.

Keywords: ulcerogenes; acidoproduction; pepsinogen; gastrin; lymphocytes; immunoglobulin.

For citation: Matveeva L.V., Mosina L.M. Interrelation secretory activity of stomach and immunes changes of peripheral blood when ulcerogenesis stomach. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2016; 60(4): 72–78. (in Russ).

For correspondence: Matveeva Ljubov V., e-mail: MatveevaLjubov1@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

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

Information about authors:

Matveeva L.V., <http://orcid.org/0000-0001-9342-3157>

Mosina L.M., <http://orcid.org/0000-0001-6831-3116>

Received 30.09.15

Введение

Язвенная болезнь (ЯБ) практически во всех странах мира является самым распространенным заболеванием системы пищеварения и часто становится причиной временной и даже стойкой утраты трудоспособности [1, 2].

В качестве одного из ведущих звеньев патогенеза ЯБ желудка рассматривается гиперсекреция соляной кислоты и ферментов в желудке [1, 3–5]. Кроме того, развитие и прогрессирование ЯБ сопровождается изменениями механизмов врожденного и адаптивного иммунитета [2–3, 5–9]. Имеются данные о влиянии ферментов, вырабатываемых слизистой оболочкой желудка (СОЖ), на функционирование секреторного иммуноглобулина А (sIgA), системы фагоцитов [5, 10–12]. Следовательно, изучение особенностей реагирования иммунной системы, секреторной активности СОЖ и коррекция выявленных нарушений могут влиять на течение ЯБ.

Цель работы: определить наличие, направленность и силу коррелятивных связей секреторной активности желудка и иммунных изменений периферической крови при обострении язвенной болезни желудка для коррекции патогенетической терапии больных.

Методика

Обследованы больные (42 человека) язвенной болезнью желудка в фазе обострения, находившихся на стационарном лечении в Мордовской республиканской клинической больнице г. Саранск, в возрасте от

26 до 65 лет, с продолжительностью заболевания от 3 до 20 лет — основная группа. Мужчин было 24 (57,14%), женщин — 18 (42,86%). Средний возраст больных составил $52,57 \pm 10,16$ года.

Контрольная группа включала 40 практически здоровых добровольцев 52,5% мужчин (21 человек), 19 женщин (47,5%), в возрасте 30–45 лет, не имеющих на момент обследования анамнестических, клинических, лабораторных и инструментальных (по данным эзофагогастродуоденоскопии — ЭГДС) признаков гастро- и иммунопатологии. Включение в группу исследования осуществлялось при положительном решении локального этического комитета и получении информированного согласия.

О состоянии кислото- и ферментообразующей функции СОЖ судили по результатам кратковременной двухчасовой внутрижелудочной рН-метрии и сывороточной концентрации пепсиногенов, гастрина до начала активного лечения больных.

Стандартную внутрижелудочную рН-метрию проводили на аппарате ацидогастрометр-03 (АГМ-03) (ЗАО НПП «Исток-Система», г.Фрязино, Россия). В качестве стимулятора желудочной секреции использовали 0,1% раствор гистамина дигидрохлорида в субмаксимальной дозировке (0,01 мг/кг массы тела). Состояние кислотообразующей функции тела желудка и кислотонейтрализующей функции антрального отдела у обследованных оценивали, сопоставляя со стандартизированными значениями рН в базальных и стимулированных условиях.

Кровь на иммунологическое исследование забирали до проведения эрадикационной и антисекреторной терапии в утренние часы натощак из локтевой вены в объеме 3 мл в пробирку с ЭДТА и 5 мл в пробирку без консервантов. Время коагуляции в пробирке не превышало 30 мин при комнатной температуре (20—25°C). Сыворотка выделялась центрифугированием в течение 10 мин и помещалась в отдельные стерильные пробирки, образцы хранились при температуре -20°C до процедуры иммуноферментного анализа (не более 6 нед.).

Иммунофенотип лимфоцитов по CD-антигенам (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD45, CD56) определяли иммунофлюоресцентным методом на проточном цитометре Cytomics FC 500 с применением моноклональных антител производства «Beckman Coulter» (США), меченных FITC (изотиоцианат флуоресцеина), PE (фикоэритрин), PC5 (комплекс PE с цианином-5) и ECD (комплекс PE с техасским красным). Для удаления эритроцитов пробоподготовку проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора OptiLyse C (Beckman Coulter, США).

Методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови определяли уровень иммуноглобулинов (Ig) изотипов M, G, A, E, пепсиногенов (PG)-I, -II с расчетом их соотношения (PG-I / PG-II) с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (г.Новосибирск, Россия), гастрин-17 (G-17) с применением тест-системы «Biohit» (г.Хельсинки, Финляндия), следуя инструкциям, приложенным к диагностическим наборам.

Результаты исследований были обработаны с помощью методов вариационной статистики с использованием программы Microsoft Excel 7.0 с расчетом средней арифметической величины, средней ошибки средней арифметической. Для оценки взаимосвязи величин определяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s), его статистическую значимость. Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$. В зависимости от знака (+) или (-) корреляция оценивалась как положительная или отрицательная соответственно. Сила взаимосвязи определялась по величине коэффициента r_s : при $r_s < 0,19$ — очень слабая, $r_s = 0,2—0,29$ — слабая; $r_s = 0,3—0,49$ — умеренная; $r_s = 0,5—0,69$ — средняя, $r_s = 0,7—1$ — сильная.

Результаты и обсуждение

Обследованные больные отличались по характеру течения ЯБ желудка. Так, легкое течение заболевания с 1 обострением в течение года определялось у 12 (28,6%), средняя тяжесть (2 рецидива в год) — у 20 (47,6%), тяжелое течение (3 рецидива в год) — у 10 (23,8%) больных.

При проведении рН-метрии у 35 (87,5%) клинически здоровых лиц, вошедших в контрольную группу, определялось нормацидное состояние кислотообразования: базальный уровень рН тела желудка колебался от 1,6 до 2,0, при стимуляции — от 1,2 до 2,0, кислотонейтрализующая функция антрального отдела была компенсирована. У 2 обследованных (5%) регистрировалась гипоацидность: повышение базального рН тела желудка до 2,2, при стимуляции — до 2,1, функция ощелачивания была компенсирована. У 3 (7,5%) людей отмечалось увеличение кислотообразования в теле желудка: базальный уровень рН снижался до 1,3, при стимуляции — до 1,0, кислотонейтрализующая функция антрального отдела была компенсирована. За период наблюдения у обследованных лиц контрольной группы гастроэзофагеальные и дуоденогастральные рефлюксы не регистрировались.

У обследованных лиц контрольной группы сывороточные концентрации PG-I, PG-II, G-17 находились в пределах нормальных колебаний и в среднем составили $74,3 \pm 6,1$ мкг/л, $12,7 \pm 1,63$ мкг/л, $4,61 \pm 0,9$ пмоль/л соответственно; при гистологическом исследовании биоптатов желудка признаки воспалительной инфильтрации, атрофии, дисплазии отсутствовали, что свидетельствовало о морфологической целостности СОЖ.

У 21 (50%) обследованного больного ЯБ наблюдалось усиление кислотообразующей функции тела желудка, сочетающееся с ослаблением кислотонейтрализующей функции антрального отдела желудка. У 18 больных (42,9%) в базальных условиях отмечалось снижение кислотообразования: у 13 (31%) — гипоацидное, у 5 (11,9%) — субанацидное состояние, сохраняющееся при стимуляции, ощелачивающая функция была суб- и декомпенсирована. У 3 (7,14%) — регистрировалась нормацидность при снижении кислотонейтрализующей функции антрального отдела желудка.

При сравнении состояния желудочной кислотопродукции у больных ЯБ желудка и клинически здоровых лиц был выявлен ряд особенностей. Гиперацидность желудка у больных регистрировалась в 6,7 раза чаще, чем у здоровых добровольцев, в то время как нормацидность — в 12,3 раза реже. Снижение кислотообразования наблюдалось в 8,6 раза чаще, что указывало на развитие атрофии СОЖ. Базальный уровень рН варьировал в разных отделах желудка и в среднем по группе в кардиальном отделе составил $3,59 \pm 0,21$, в теле желудка — $1,96 \pm 0,15$ и статистически значимо не отличался от контроля. Базальный уровень рН в антральном отделе ($2,29 \pm 0,13$) был статистически значимо ниже (на 54,5%), чем в контрольной группе, что свидетельст-

вовало о снижении кислотонейтрализующей функции. При стимуляции уровень рН в кардиальном отделе желудка ($3,48 \pm 0,16$) значимо не отличался ни от базальных значений, ни от данных контроля. Стимулированный уровень рН в теле желудка ($1,81 \pm 0,12$) в среднем по группе снижался относительно базальных значений не существенно (на 7,7%), что могло быть обусловлено атрофическими изменениями слизистой и уменьшением количества париетальных клеток. В антральном отделе рН при стимуляции ($3,06 \pm 0,22$) статистически значимо возрастал (на 33,6%), но был существенно ниже значений контроля (на 48,7%), что на фоне клинико-морфологической картины указывало на недостаточность функции ощелачивания желудочного содержимого.

При иммуноферментном анализе количества пепсиногенов у больных ЯБ желудка наблюдалось статистически значимое увеличение сывороточного уровня РG-I относительно контроля на 33,4% ($99,1 \pm 4,7$ мкг/л), РG-II — на 52% ($19,3 \pm 1,28$ мкг/л). Выявленное у обследованных больных превалирование повышения уровня РG-II (маркер воспаления СОЖ) относительно контроля над увеличением количества РG-I служит фактором риска развития язвы желудка [12]. При расчете соотношения сывороточных концентраций РG-I и РG-II у больных отмечалось его увеличение — 5:1 — при сравнении с результатами контрольной группы (4:1), что, согласно данным проведенных ранее исследований, способствует язвообразованию [11—12]. Полученные результаты можно объяснить способностью пепсиногенов, особенно РG-I, усиливать активность лизосомальных ферментов фагоцитирующих клеток, способствовать внутриклеточному протеолизу и, тем самым, ультрагенезу СОЖ [3]. Таким образом, у обследованных больных с обострением язвенной болезни желудка наблюдаются изменения кислото- и ферментопродукции, способствующие развитию язвенного дефекта СОЖ и поддерживающие воспалительный процесс.

При иммунологическом обследовании больных изменения показателей не зависели от локализации язвенного дефекта и определялись выраженностью воспалительного процесса в СОЖ.

При тяжелом течении ЯБ желудка у 23,8% (10 человек) обследованных наблюдались лейкоцитоз (до $12,3 \times 10^9$ /л), нейтрофилез (до 78%, $6,8—7,4 \times 10^9$ /л), моноцитопения, снижение погложительной, усиление переваривающей кислородзависимой активности фагоцитов в виде увеличения количества формазанположительных клеток (ФПК) до 56%, среднего цитохимического коэффициента нейтрофилов (СЦК/НСТ) — до 0,64 усл. ед.). При среднетяжелом течении заболевания изменения были

менее выражены. У 4 больных (9,52%) отмечалось снижение в периферической крови численности нейтрофилов на фоне увеличения количества моноцитов, что указывало на активный тканевой воспалительный процесс.

При анализе состояния клеточного иммунитета наблюдались признаки дисбаланса в виде увеличения лейко-Т-индекса (на 54%), иммунорегуляторного индекса ($CD4^+/CD8^+$) на 37,8%, абсолютного числа $CD4^+$ -клеток на 33,5%, относительного и абсолютного количества $CD16^+$ -лимфоцитов на 68,9 и 77,5% соответственно на фоне «ареактивности» $CD8^+$ -лимфоцитов. Выявленные изменения были наиболее выражены при тяжелом течении ЯБ желудка. Следует отметить, что у 5 больных (11,9%) лейко-Т-индекс повышался до 8,4—9,6, а у одного больного (2,38%) — до 10,4, что свидетельствовало о наличии иммунодефицитного состояния I и II степени соответственно [13].

У больных с обострением ЯБ желудка при сравнении с данными контроля отмечались значимые изменения и в гуморальном иммунитете: уменьшение относительного количества $CD19^+$ -лимфоцитов (на 31%), характерное для активного воспалительного процесса, снижения IgG (на 30%), свидетельствующие о возможной недостаточности антителопродукции. Одновременно у больных наблюдалось увеличение уровня IgM (на 39,7%), что указывало на острый воспалительный процесс, секреторного IgA (sIgA) (на 356%) — раздражение слизистых оболочек, напряженность мукозального иммунитета, IgE (на 206,8%) — на присоединение аллергического компонента и усиление гистаминовых воздействий на СОЖ. Накопление циркулирующих иммунных комплексов (особенно средних и мелких размеров) в крови обследованных больных, наиболее выраженное при тяжелом течении ЯБ желудка, способно приводить к нарушению микроциркуляции крови и поддержанию воспалительного процесса, что свидетельствует о недостаточности элиминационных иммунных механизмов.

У больных с обострением ЯБ желудка были выявлены статистически значимые коррелятивные связи между рН антрального отдела желудка в базальных и стимулированных условиях и количеством лейкоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, ФПК, активностью фагоцитоза, СЦК/НСТ (отрицательные связи умеренной силы), количеством моноцитов — положительная связь умеренной силы (табл. 1). Сывороточный уровень РG-I был умеренно взаимосвязан с численностью моноцитов — обратная зависимость, количеством эозинофилов, ФПК, активностью фагоцитоза — прямая зависимость. Сывороточный уровень РG-II проявлял аналогичные взаимосвязи, дополни-

тельно положительно коррелируя с количеством нейтрофилов и СЦК/НСТ. Концентрация в сыворотке крови G-17 показала умеренную обратную связь с количеством лейкоцитов, эозинофилов, ФПК, прямую связь умеренной силы с количеством нейтрофилов, моноцитов, средней силы — с СЦК/НСТ ($r_s = +0,501, \rho < 0,01$).

pH антрального отдела желудка в базальных условиях проявлял отрицательную связь умеренной силы с численностью CD3⁺-, CD4⁺-лимфоцитов, индексом CD4⁺/CD8⁺, средней силы — с лейко-T-индексом, количеством CD16⁺-клеток и положительную связь умеренной силы с численностью

CD8⁺-лимфоцитов (табл. 2). При стимуляции показатель pH антрального отдела желудка обнаружил обратную взаимосвязь с количеством CD3⁺-, CD4⁺-CD16⁺-клеток, лейко-T-индексом и прямую — с CD8⁺-лимфоцитами. Отрицательные коррелятивные связи умеренной силы определялись между сывороточным уровнем PG-I и количеством CD3⁺-, CD4⁺-клеток, индексом CD4⁺/CD8⁺, положительные — между PG-I и лейко-T-индексом, численностью CD16⁺-лимфоцитов. Количество PG-II в сыворотке крови показал обратную взаимосвязь с численностью CD45⁺-, CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-лимфоцитов, индексом CD4⁺/CD8⁺ и прямую — с лей-

Таблица 1

Взаимосвязь показателей секреторной активности желудка и системы фагоцитов крови у больных с обострением язвенной болезни желудка

Показатель	pH антрального отдела, базал.	pH антрального отдела, стимул.	PG-I	PG-II	G-17
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	-0,330 *	-0,376 *	-0,207	-0,239	-0,338 *
Нейтрофилы, %	-0,280	-0,314 *	+0,291	+0,353 *	+0,206
Нейтрофилы, $\times 10^9/\text{л}$	-0,375 *	-0,390 **	+0,271	+0,315 *	+0,344 *
Моноциты, %	+0,372 *	+0,403 **	-0,369 *	-0,483 **	+0,305 *
Моноциты, $\times 10^9/\text{л}$	+0,378 *	+0,413 **	-0,363 *	-0,411 **	+0,352 *
Эозинофилы, %	-0,228	-0,315 *	+0,397 **	+0,368 *	-0,226
Эозинофилы, $\times 10^9/\text{л}$	-0,305 *	-0,360 *	+0,309 *	+0,302 *	-0,362 *
Активность фагоцитоза, %	-0,422 **	-0,440 **	+0,491 **	+0,460 **	+0,227
ФПК, %	-0,395 **	-0,420 **	+0,377 *	+0,477 **	-0,360 *
СЦК/НСТ, усл. ед.	-0,403 **	-0,413 **	+0,269	+0,354 *	+0,501 **

Примечание. «+» - прямая связь; «-» - обратная связь; * - статистически значимые различия при $p \leq 0,05$, ** - при $p \leq 0,01$.

Таблица 2

Взаимосвязь показателей секреторной активности желудка и клеточного иммунитета у больных с обострением язвенной болезни желудка

Показатель	pH антрального отдела, базал.	pH антрального отдела, стимул.	PG-I	PG-II	G-17
CD45 ⁺ -лимфоциты, %	-0,254	-0,280	-0,265	-0,305 *	-0,219
CD45 ⁺ -лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	-0,196	-0,230	-0,281	-0,389 *	-0,304 *
CD3 ⁺ -лимфоциты, %	-0,325 *	-0,294	-0,308 *	-0,269	-0,547 **
CD3 ⁺ -лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	-0,289	-0,318 *	-0,276	-0,386 *	-0,509 **
Лейко-T-индекс	-0,510 **	-0,468 **	+0,313 *	+0,371 *	+0,362 *
CD4 ⁺ -лимфоциты, %	-0,316 *	-0,352 *	-0,385 *	-0,327 *	-0,461 **
CD4 ⁺ -лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	-0,297	-0,340 *	-0,316 *	-0,308 *	-0,336 *
CD8 ⁺ -лимфоциты, %	+0,362 *	+0,402 **	-0,294	-0,284	-0,287
CD8 ⁺ -лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	+0,335 *	+0,410 **	-0,210	-0,443 **	-0,300 *
CD4 ⁺ -/CD8 ⁺ -индекс	-0,307 *	-0,320 *	-0,342 *	-0,312 *	-0,307 *
CD16 ⁺ -лимфоциты, %	-0,545 **	-0,430 **	+0,334 *	+0,247	+0,568 **
CD16 ⁺ -лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	-0,505 **	-0,418 **	+0,307 *	+0,344 *	+0,502 **

Примечание. «+» — прямая связь; «-» — обратная связь; * — статистически значимые различия при $p \leq 0,05$, ** — при $p \leq 0,01$.

Взаимосвязь показателей секреторной активности желудка и гуморального иммунитета у больных с обострением язвенной болезни желудка

Показатель	pH антрального отдела, базал.	pH антрального отдела, стимул.	PG-I	PG-II	G-17
CD19 ⁺ -лимфоциты, %	+0,252	+0,310 *	-0,213	-0,301 *	+0,303 *
CD19 ⁺ -лимфоциты, $\times 10^9$ /л	+0,288	+0,316 *	-0,265	-0,396 **	+0,212
IgG	+0,530 **	+0,548 **	-0,222	+0,513 **	+0,203
IgM	-0,508 **	-0,520 **	+0,279	-0,276	-0,403 **
IgA	+0,304 *	+0,313 *	+0,220	+0,501 **	+0,237
sIgA	-0,410 **	-0,435 **	+0,390 **	+0,347 *	-0,230
IgE	-0,269	-0,280	-0,365 *	-0,479 **	+0,206
ЦИК, крупные	-0,326 *	-0,365 *	+0,362 *	+0,394 **	+0,329 *
ЦИК, средние	-0,512 **	-0,517 **	+0,503 **	+0,515 **	+0,391 **
ЦИК, мелкие	-0,495 **	-0,504 **	+0,389 *	+0,317 *	+0,415 **
Комплемент	-0,292	-0,324 *	+0,366 *	+0,245	+340 *

Примечание. «+» — прямая связь; «-» — обратная связь; * — статистически значимые различия при $p \leq 0,05$, ** — при $p \leq 0,01$.

ко-Т-индексом, численностью CD16⁺-клеток. Уровень G-17 проявлял корреляцию средней силы с количеством CD3⁺-клеток (отрицательная), CD16⁺-клеток (положительная), умеренной силы — с абсолютным количеством CD45⁺-, CD8⁺-лимфоцитов, численностью CD4⁺-клеток, индексом CD4⁺/CD8⁺ (отрицательная), лейко-Т-индексом (положительная).

У больных рН антрального отдела в базальных условиях проявлял обратную связь средней силы с количеством IgM, ЦИК средних размеров, умеренной силы — с количеством sIgA, ЦИК крупных и мелких размеров, прямую связь средней силы — с количеством IgG ($r_s = +0,530$, $p < 0,01$). Стимулированный рН антрального отдела обнаруживал корреляцию средней силы с количеством IgG (положительная), IgM, ЦИК средних, мелких размеров (отрицательная), умеренной силы — с количеством CD19⁺-лимфоцитов, IgA (положительная), sIgA, ЦИК крупных размеров, комплемента (отрицательная). Сывороточная концентрация PG-I показала обратную взаимосвязь с уровнем IgE, прямую — с количеством sIgA, ЦИК всех размеров, комплемента. Положительная взаимосвязь сывороточного уровня PG-II средней силы определялась с количеством IgG, IgA, ЦИК средних размеров, умеренной силы — с содержанием в сыровотке крови sIgA, ЦИК крупных, мелких размеров, отрицательная связь умеренной силы — с количеством CD19⁺-лимфоцитов и IgE. Концентрация в сыровотке крови G-17 показала умеренную прямую связь с относительным количеством CD19⁺-лимфоцитов, ЦИК всех размеров, комплемента, обратную связь умеренной силы с количеством IgM (табл. 3).

Заключение

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии положительных и отрицательных коррелятивных связей умеренной и средней силы между показателями секреторной активности СОЖ, врожденного и адаптивного иммунитета у больных с обострением ЯБ желудка. Наличие и характер данных взаимосвязей следует учитывать при назначении антисекреторных препаратов. При тяжелом и среднетяжелом течении ЯБ желательное проведение динамического комплексного иммунологического обследования и назначение персонифицированной иммунотерапии.

References

1. Kalinin A.V., Loginov A.F., Hazanov A.I., red. *Gastroenterology and Hepatology: Diagnosis and Treatment: a guide for doctors. [Gastroenterologiya i gepatologiya: diagnostika i lechenie: rukovodstvo dlya vrachej]*. M.: MEDpress-inform; 2011: 107-62. (in Russian)
2. Matveeva L.V., Gorjaev V.M., Chudajkin A.N., Tremaskina O.N. The changes subpopulations lymphocyte blood with gastroduodenal bleeding. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal*. 2014; 8 (3): 343-5. (in Russian)
3. Sokolova G.N., Potapova V.B. *Clinico-pathogenetic aspects of gastric ulcer. [Kliniko-patogeneticheskie aspekty yazvennoy bolezni zheludka]*. M.; Anaharsis; 2009. (in Russian)
4. Borisov Ju.Ju. State of mucous protective barrier and stomach secretory activity in patients with duodenal ulcer. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2014; 2: 317. (in Russian)
5. Men'shikova E.A., Dobrodeeva L.K., Krivonogova O.V. The immunoresponsiveness at northerners and gastrin-17, pepsinogen contents in peripheral blood. *Jekologiya cheloveka*. 2009; 7: 11-4. (in Russian)
6. Gureev A.N., Cvetkova L.N., Hromova S.S., Vaneeva N.P. Immune regulation in the development of duodenal ulcer in children. *Pediatrics*. 2008; 87 (6): 34-6. (in Russian)

7. Matveeva L.V., Stenina M.A., Mosina L.M. Cytokine regulation of ulcerogenesis in gastroduodenal mucosa. *Medsinskaya immunologiya*. 2013; 15 (2): 107-18. (in Russian)
8. Muslimova M.Ju., Al'tman D.A. Immune peculiarities of the mature and senium patients suffering from peptic and duodenal ulcer. *Vestnik Yuzhno-Ural'skogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: obrazovanie, zdravooohranenie, fizicheskaya kul'tura*. 2008; 19 (199): 91-4. (in Russian)
9. Smirnova T.A., Ponomareva E.P., Hanferyan R.A., Kolesnikov V.V. Outpatient ronkoleukin treatment of gastric ulcer associated with Helicobacter pylori. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2009; 2: 30-6. (in Russian)
10. Matveeva L.V., Stenina M.A., Mosina L.M. Related changes of serum cytokines and markers of the secretory activity of the gastric mucosa at ulcerous process. *Medsinskaya immunologiya*. 2013; 15 (3): 289-92. (in Russian)
11. Molchanova A.R., Sorokina N.N., Rukavishnikov M.Yu. Diagnostic value of complex laboratory research pepsinogenov. *Novosti «Vektor-Best»*. 2010; 2 (56): 7-10. (in Russian)
12. Sipponen P., Harkonen M., Alanko A. Diagnosis of Atrophic Gastritis from a Serum Sample. *Clinicheskaya Laboratoriya*. 2002; 48: 505-15.
13. Haitov R.M. *Immunology: structure and function of the immune system. [Immunologiya: struktura i funktsii immunnoy sistemy]*. M.: GJeOTAR-Media; 2013. 280 s. (in Russian)

Сведения об авторах:

Мосина Лариса Михайловна, доктор мед. наук, доцент, проф. каф. госпитальной терапии, e-mail: lardoc@rambler.ru

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616-092.9 + 616-01/09

Тиньков А.А.^{1,2,3,4}, Гатиатулина Е.Р.^{1,5}, Попова Е.В.¹, Полякова В.С.¹, Скальная А.А.⁶,
Аглетдинов Э.Ф.⁷, Никоноров А.А.^{1,2}, Радыш И.В.⁴, Карганов М.Ю.⁸, Скальный А.В.^{2,3,4,9}

Влияние адипогенной диеты в раннем возрасте на содержание микроэлементов в тканях крыс

- ¹ — ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, 460000, г.Оренбург, ул. Советская, д. 6
- ² — Институт биоэлементологии (Российский спутниковый центр Института микроэлементов при ЮНЕСКО), ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», 460018, г.Оренбург, просп. Победы, д. 13
- ³ — ГОУ ВПО «Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова», 150000, г.Ярославль, ул. Советская, д. 14
- ⁴ — ФГБОУ ВПО «Российский Университет дружбы народов» 117198, г.Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
- ⁵ — ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 454076, г.Челябинск, ул. Воровского, д. 64
- ⁶ — ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119192, г.Москва, Ломоносовский пр., д. 31, корп. 5
- ⁷ — ГБОУ ВПО «Башкирский Государственный Медицинский Университет Минздрава России», 450000, г.Уфа, ул. Ленина, д. 3
- ⁸ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г.Москва, ул. Балтийская, д. 8
- ⁹ — ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», 117216, г.Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1

Цель — изучение влияния высокожировой диеты на микроэлементный статус, уровень адипокинов и некоторые показатели углеводного и липидного обмена у молодых крыс линии Вистар. **Методика.** Исследовано 2 группы молодых самцов крыс Вистар (20 особей, возраст 1 мес.): 1-я гр. получала 1 мес. стандартную диету (СТД), 2-я — высокожировую диету (ВЖД). Определяли микроэлементный статус (с использованием масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой), уровень адипокинов (инсулина, лептина и адипонектина) (методом иммуноферментного анализа), общего холестерина (ОХ), триацилглицеридов (ТАГ), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП), глюкозы (спектрофотометрически); аполипопротеинов А1 (АпоА1) и В (АпоВ) (иммунотурбидиметрическим методом) в сыворотке. **Результаты.** Показано, что содержание животных в течение 1 мес. на ВЖД приводит к увеличению эпидидимальной, ретроперитонеальной и общей массы жировой ткани, площади адипоцитов, а также статистически значимому повышению уровня сывороточного лептина и соотношения лептин/адипонектин. Статистически значимых изменений показателей липидного спектра крови, адипонектина, аполипопротеинов, глюкозы, инсулина и индекса НОМА-IR под влиянием ВЖД выявлено не было. Анализ МЭ статуса животных позволил выявить существенное снижение под влиянием ВЖД уровня Cu, I, Mn, Se и Zn в печени, Cr, V, Co, Cu, Fe и I в эпидидимальной и Co, Cu, I, Cr, V, Fe и Zn в ретроперитонеальной жировой ткани, В опытной группе животных также было обнаружено увеличение содержания Co, Mn, Si и V и снижение Se и I в шерсти по сравнению с контрольными значениями. При этом в сыворотке животных, содержащихся на ВЖД, было выявлено снижение только Cu. **Заключение.** Можно сделать вывод о взаимосвязи выявленных нарушений микроэлементного баланса у молодых крыс, находящихся на ВЖД с повышенным отложением жира и развитием дисбаланса адипокинов. Предполагается, что изменения микроэлементного статуса являются первичными и предшествуют другим нарушениям метаболизма, вызванным ожирением.

Ключевые слова: повышение жиротложения; хром; ванадий; жировая ткань; ожирение.

Для цитирования: Тиньков А.А., Гатиатулина Е.Р., Попова Е.В., Полякова В.С., Скальная А.А., Аглетдинов Э.Ф., Никоноров А.А., Радыш И.В., Карганов М.Ю., Скальный А.В. Влияние адипогенной диеты в раннем возрасте на содержание микроэлементов в тканях крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 79–85.

Для корреспонденции: Тиньков Алексей Алексеевич, канд. мед. наук, асс. каф. биологической химии ГБОУ ВПО ОрГМУ Минздрава РФ; инженер-исследователь УНИ ГБОУ ВПО ЯрГУ им. П. Г. Демидова; ст. науч. сотр. Института биоэлементологии ФГБОУ ВО ОГУ, науч. сотр. «Медицинский институт» ФГБОУ ВПО РУДН, e-mail: tinkov.a.a@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.06.2016

Tinkov A.A.^{1,2,3,4}, Gatiatulina E.R.^{1,5}, Popova E.V.¹, Polyakova V.S.¹, Skalnaya A.A.⁶, Agletdinov E.F.⁷, Nikonorov A.A.^{1,2}, Radysh I.V.⁴, Karganov M.Yu.⁸, Skalny A.V.^{2,3,4,9}

The impact of adipogenic diet on rats' tissue trace elements content

¹ – Orenburg State Medical University, 460000, Orenburg, Sovetskaya St., 6

² – Institute of Bioelementology (Russian Satellite Centre of Trace Element – Institute for UNESCO), Orenburg State University, 460352, Orenburg, Pobedy Ave, 13

³ – Yaroslavl State University, 150000, Yaroslavl, Sovetskaya St., 14

⁴ – RUDN University, 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya St., 6

⁵ – South-Ural State Medical University, 454076, Chelyabinsk, Vorovskogo St., 64

⁶ – Lomonosov Moscow State University, 119192, Moscow, Lomonosovskiy Pr., bld. 31, 5

⁷ – Bashkir State Medical University, 450000, Ufa, Lenina St., 3

⁸ – Institute of General Pathology and Pathophysiology, 125315, Moscow, Baltiyskaya st. 8

⁹ – All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR), 117216, Moscow, Grina St., 7-1

The purpose. The influence of high-fat diet (HFD) on trace elements status, adipokine level, and markers of carbohydrate and lipid metabolism in weanling Wistar rats was investigated. **Methods.** A total of 20 male 1-months-old Wistar rats divided into two equal groups were used in the present study. The first group of animals obtained a standard diet (STD), whereas animals from the second group (NAFLD) were maintained on high-fat diet containing 10 and 31.6% of total calories from fat, respectively, during 1 month. Fat diet (HFD). Trace element status (using inductively coupled plasma mass spectrometry), serum levels of insulin, adiponectin, and leptin (using enzyme-linked immunosorbent assay), total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), glucose (spectrophotometrically), apolipoprotein A1 (ApoA1) and B (ApoB) (using immunoturbidimetric method) were assessed. **Results.** It was shown that 1-month HFD feeding resulted in significant increase of EDAT, RPAT, total adipose tissue mass, and adipocyte area. HFD-fed animals were also characterized by a significant increase in circulating leptin levels and leptin-to-adiponectin ratio as compared to the control ones. No significant HFD-related difference in serum lipid spectrum, adiponectin, apolipoproteins, glucose, insulin, and HOMA-IR were revealed. Liver Cu, I, Mn, Se, Zn; EDAT Cr, V, Co, Cu, Fe, I, and RPAT Co, Cu, I, Cr, V, Fe, and Zn were significantly decreased in HFD-fed rats in comparison with the control group levels. Hair Co, Mn, Si, and V levels significantly exceeded the respective control values, whereas Se and I content were decreased in studied animals. At the same time, only serum Cu was significantly decreased in HFD-fed rats. **Conclusion.** The interplay between the impaired trace elements metabolism of HFD-fed weanling Wistar rats and disorder of adipokine balance was demonstrated. It is supposed that the altered trace elements status is primary and precedes other metabolic obesity-related disturbances.

Keywords: adiposity; chromium; vanadium; adipose tissue; obesity.

For citation: Tinkov A.A., Gatiatulina E.R., Popova E.V., Polyakova V.S., Skalnaya A.A., Agletdinov E.F., Nikonorov A.A., Radysh I.V., Karganov M.Yu., Skalny A.V. The impact of adipogenic diet on rats' tissue trace elements content. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2016; 60 (4): 79–85. (in Russ.).

For correspondence: Tinkov Alexey Alexeyevich, MD, PhD, assistant of Biochemistry department, Orenburg State Medical University, 460000, Orenburg, Sovetskaya St., 6.; research fellow, Institute of Bioelementology (Russian Satellite Centre of Trace Element – Institute for UNESCO), Orenburg State University, 460352, Orenburg, Pobedy Ave. 13.; research fellow, Yaroslavl State University, 150000, Yaroslavl, Sovetskaya St., 14; research fellow, RUDN University, 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya St., 6; e-mail: tinkov.a.a@gmail.com

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

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

Gatiatulina E.R., <http://orcid.org/0000-0002-6360-2194>

Popova E.V., <http://orcid.org/0000-0001-6703-4756>

Polyakova V.S., <http://orcid.org/0000-0002-2930-2673>

Skalnaya A.A., <http://orcid.org/0000-0001-5938-9194>

Agletdinov E.F., <http://orcid.org/0000-0002-6256-2020>

Nikonorov A.A., <http://orcid.org/0000-0001-7214-8176>

Radysh I.V., <http://orcid.org/0000-0003-0939-6411>

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

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

Received 20.06.2016

Введение

По данным ВОЗ, ожирение — всемирно распространенная проблема. С 1980 года его масштабы по всему миру увеличились более чем в два раза [1]. Особое место в данной проблеме занимает ожирение среди детей, которое значительно выросло за последние три десятилетия [2]. Согласно отчету ВОЗ, число детей с избыточной массой тела в возрасте до пяти лет в 2013 году превысило 42 млн [1].

Микроэлементы (МЭ) играют важную роль в обеспечении практически всех метаболических путей реализации физиологических функций различных клеток, а нарушение микроэлементного статуса может играть существенную роль в развитии целого ряда заболеваний [3]. В частности, такие микроэлементы, как Cr, Zn, V и Se считаются ключевыми элементами в развитии нарушений углеводного обмена [4]. Кроме того, в ряде исследований выявлены нарушения гомеостаза железа при ожирении [5]. Множественные клинические [6] и экспериментальные [7] исследования показали тесную взаимосвязь между балансом МЭ и нарушениями метаболических процессов при ожирении. При этом большинство экспериментальных работ было выполнено с использованием взрослых животных, в то время как данных о влиянии ожирения на микроэлементный статус в раннем возрасте недостаточно.

Цель исследования — изучение влияния алиментарного ожирения на содержание микроэлементов в тканях молодых самцов крыс Wistar.

Методика

Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом и соответствовал требованиям Хельсинкской декларации 1975 года и ее пересмотренного варианта 2008 г. Самцы крыс Wistar в возрасте 21 сут были разделены на две равные группы ($n = 10$), содержащиеся на СТД и ВЖД диетах соответственно в течение 1 мес. Все животные имели свободный доступ к еде и питьевой воде. Стандартный гранулированный корм, содержащий 270 ккал / 100 г (20% белка, 70% углеводов, 10% жира), был использован в качестве СТД. ВЖД, основанная на добавлении свиного сала, содержала 31,6% калорий за счет жира, 15,2% белка и от 53,2% из углеводов. Значимых различий в минеральном составе диет выявлено не было.

По окончании эксперимента производили взвешивание животных. Образцы эпидидимальной (ЭДЖТ) и ретроперитонеальной (РПЖТ) жировой ткани и печени использовали для химического анализа, ЭДЖТ исследовали гистологически. Среды ЭДЖТ окрашивали гематоксилином и эозином и по-

следующей морфометрии. Анализ площади адипоцитов проводили с использованием приложения ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

Определение содержания общего холестерина (ОХ), триацилглицеридов (ТАГ), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП) и глюкозы в сыворотке проводили спектрофотометрически с использованием соответствующих наборов реагентов Roche. Определение уровней аполипопротеинов А1 (АпоА1) и В (АпоВ) выполнено иммунотурбидиметрическим методом. Вышеуказанные анализы проводили при помощи автоматического анализатора «COBAS Integra 400 plus» (Roche, Швейцария).

Определение содержания инсулина (набор реагентов «AccuBind»), лептина («Biovondor») и адипонектина («USCN Life Science Inc.») осуществлялось с использованием иммуноферментного анализа стандартными наборами реагентов на спектрофотометре Multiscan MS (LabSystem Multiscan MS, Хельсинки, Финляндия) в соответствии с инструкциями изготовителя. Полученные данные по содержанию глюкозы и инсулина в сыворотке крови были использованы для расчета индекса инсулинорезистентности (НОМА-IR) [8]: $\text{НОМА-IR} = (\text{глюкоза} \times \text{инсулин}) / 22,5$.

Содержание МЭ в шерсти, сыворотке крови, печени и жировой ткани определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на приборе Nexion 300D (PerkinElmer Inc., США), после микроволнового разложения образцов.

Полученные данные были проанализированы с использованием Statistica 10.0 (Statsoft, США). Нормально распределенные данные (в соответствии с результатами теста Шапиро—Уилка) представлены в виде средних величин и стандартного отклонения. Для выражения значений, не характеризовавшихся нормальным распределением, использовалась медиана и величины 25 и 75 перцентилей. Сравнительный анализ данных был проведен с использованием однофакторного дисперсионного анализа и U-теста Манн—Уитни для данных, характеризующихся нормальным и ненормальным распределением соответственно при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Употребление ВЖД в течение 1 мес. существенно не влияет на массу тела у молодых особей ($70,7 \pm 9,8$ г vs $75,0 \pm 11,3$ г, $p = 0,461$), но при этом вызывает статистически значимое увеличение содержания ЭДЖТ ($2,62 \pm 0,40$ г vs $3,49 \pm 0,78$ г; $p = 0,018$), РПЖТ ($1,52 \pm 0,40$ г vs $3,08 \pm 0,68$ г;

$\rho < 0,001$), а также суммарной массы жировой ткани ($4,14 \pm 0,76$ г vs $6,57 \pm 1,27$ г; $\rho = 0,001$) на 34, 103 и 59% соответственно. Значимое ($\rho < 0,001$) увеличение площади адипоцитов при ВЖД (1298 ± 561 мкм²) на 82%, по сравнению с контрольными показателями (2339 ± 978 мкм²), свидетельствует о гипертрофии адипоцитов. При этом уровень циркулирующего лептина ($88,1 \pm 9,9$ нг/мл vs $213,4 \pm 54,7$ нг/мл; $\rho < 0,001$) и соотношение лептин/адипонектин ($7,2 \pm 0,96$ vs $17,9 \pm 8,3$; $\rho < 0,001$) у животных из группы ВЖД статистически значимо превышали контрольные значения более чем в 2 раза, однако существенных изменений в уровне сывороточного адипонектина выявлено не было ($12,3 \pm 1,8$ нг/мл vs $13,2 \pm 3,4$ нг/мл; $\rho = 0,495$).

Употребление ВЖД не приводило к статистически значимому изменению уровня глюкозы ($10,9 \pm 1,2$ ммоль/л vs $11,6 \pm 1,2$ ммоль/л; $\rho = 0,273$), инсулина ($3,6 \pm 0,99$ мМЕ/л vs $3,2 \pm 0,88$ мМЕ/л; $\rho = 0,247$), значений НОМА-IR ($1,73 \pm 0,41$ vs $1,70 \pm 0,50$; $\rho = 0,793$), а также содержания в сыворотке крови АпоА1 ($0,01$ ($0,01—0,02$) г/л vs $0,01$ ($0,01—0,01$) г/л; $\rho = 0,492$), АпоВ ($0,03$ ($0,02—0,03$) г/л vs $0,02$

($0,01—0,03$) г/л; $\rho = 0,304$) и их соотношения ($0,5$ ($0,3—1,0$) vs $0,5$ ($0,3—1,0$); $\rho = 0,968$). Несмотря на 24% и 20%, увеличение уровней ТАГ ($0,97 \pm 0,23$ ммоль/л vs $1,1 \pm 0,39$ ммоль/л; $\rho = 0,520$) и ХС-ЛПВП ($1,9 \pm 0,37$ ммоль/л vs $2,1 \pm 0,32$ ммоль/л; $\rho = 0,226$) в сыворотке крови опытной группы животных, данные изменения не были статистически значимыми. Интересным фактом является снижение у ВЖД-животных уровня ХС-ЛПНП в сыворотке на 32% по сравнению с контролем ($0,48 \pm 0,13$ ммоль/л vs $0,31 \pm 0,08$ ммоль/л; $\rho = 0,004$).

В отличие от изучаемых биохимических показателей, содержание МЭ в тканях оказалось более подвержено влиянию ВЖД. Так, месячный курс ВЖД приводил к значительному уменьшению содержания МЭ в печени (табл. 1). В частности, концентрации Cu, I, Mn, Se, Zn были снижены на 14, 26, 21, 15, и 10% соответственно по сравнению с таковыми у интактных животных. Изменений в содержании других МЭ в печени обнаружено не было.

В отличие от распределения МЭ в печени, в сыворотке животных, получавших ВЖД, отмечалось лишь

Таблица 1

Содержание микроэлементов в печени (мкг/г) и сыворотке (мкг/мл) экспериментальных животных

Элемент	Стандартная диета	Высокожировая диета	Значение p
Печень			
Co	0,040 (0,030—0,040)	0,040 (0,030—0,040)	0,714
Cr	0,020 (0,010—0,020)	0,020 (0,020—0,030)	0,392
Cu	4,070 (3,860—4,300)	3,495 (3,100—3,780)	0,002 *
Fe	64,960 (52,700—67,450)	63,250 (56,450—70,000)	0,791
I	0,095 (0,070—0,110)	0,070 (0,060—0,080)	0,029 *
Mn	2,725 (2,670—2,780)	2,145 (2,060—2,320)	<0,001 *
Se	0,890 (0,870—0,920)	0,755 (0,740—0,780)	<0,001 *
V	0,0008 (0,0007—0,0009)	0,001 (0,0008—0,001)	0,375
Zn	30,960 (28,930—33,410)	27,805 (24,480—28,840)	0,017 *
Сыворотка			
Co	0,002 (0,001—0,002)	0,002 (0,001—0,002)	0,597
Cr	0,005 (0,004—0,006)	0,0045 (0,004—0,007)	0,678
Cu	1,310 (1,110—1,510)	1,040 (0,950—1,090)	0,026 *
Fe	2,450(1,810—3,740)	2,340 (1,340—3,510)	0,705
I	0,080 (0,070—0,090)	0,090 (0,080—0,100)	0,496
Mn	0,006 (0,005—0,007)	0,006 (0,005—0,008)	0,791
Se	0,595 (0,500—0,680)	0,535 (0,410—0,590)	0,199
V	0,00025 (0,0002—0,0003)	0,0002 (0,0002—0,0003)	0,791
Zn	1,330 (1,130—1,780)	1,330 (1,200—1,430)	0,970

Примечание. Данные представлены как Медиана и величины 25 — 75 перцентилей; * — достоверность различий $p < 0,05$ в соответствии с U-тестом Манн-Уитни

21%-ное снижение уровня Cu по сравнению с контролем.

Стоит отметить, что уровень микроэлементов в жировой ткани также значительно изменялся под воздействием ВЖД (табл. 2). При этом максимально выраженное снижение в ЭДЖТ было обнаружено для Cr и V — примерно в 2 раза ниже, чем у контрольных животных. Снижение содержания Co, Cu, Fe и I было менее выражено и составило 30, 27, 48, и 40% по сравнению с соответствующими контрольными значениями. Несмотря на 31% уменьшение концентрации Zn под влиянием ВЖД в ЭДЖТ, это изменение не было статистически значимым.

В РПЖТ при ВЖД существенно снижался уровень Cr, Co, I в 3, 2,5 и 2 раза соответственно. Снижение содержания Cu и V было менее выражено, составляя 37 и 38% соответственно, по сравнению контролем.

Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о повышении жиротложения при ВЖД. Данный морфологический факт подтверждается уровнем лептина

в опытной группе, поскольку его повышение характерно для увеличения массы жировой ткани [9]. Интересен факт отсутствия статистически значимого увеличения веса у молодых животных под влиянием ВЖД. В то же время, некоторые исследования показывают даже понижение массы тела у ювенильных крыс, находящихся на диете с высоким содержанием жиров [10]. Отсутствие значимых изменений в уровне сывороточного адипонектина в наших исследованиях под влиянием ВЖД также может указывать на отсутствие формирования дисфункции адипоцитов, которое наблюдается при более выраженном ожирении [9]. Учитывая противовоспалительную и инсулин-сенсibiliзирующую роль адипонектина [11], отсутствие различий между концентрациями у животных с ВЖД и контрольными может служить объяснением молекулярных механизмов отсутствия инсулинорезистентности. Это предположение также подтверждается неизменной концентрацией глюкозы в сыворотке крови, инсулина и НОМА-IR. Наблюдаемая ситуация может быть обусловлена коротким периодом алиментарного влияния ВЖД, что согласуется с ранее проведенными исследованиями [12].

Таблица 2

Содержание микроэлементов (мкг/г) в эпидидимальной и ретроперитонеальной жировой ткани крыс

Элемент	Стандартная диета	Высокожировая диета	Значение p
Эпидидимальная жировая ткань			
Co	0,001 (0,001—0,002)	0,0007 (0,0006—0,0010)	0,013 *
Cr	0,040 (0,020—0,080)	0,020 (0,010—0,020)	0,014 *
Cu	0,260 (0,240—0,340)	0,190 (0,170—0,220)	0,008 *
Fe	6,460 (5,400—7,670)	3,305 (2,900—4,140)	0,007 *
I	0,050 (0,030—0,060)	0,030 (0,020—0,040)	0,047 *
Mn	0,050 (0,040—0,060)	0,040 (0,040—0,040)	0,177
Se	0,0100 (0,0039—0,0400)	0,0065 (0,0039—0,0300)	0,631
V	0,0008 (0,0005—0,0010)	0,0004 (0,0002—0,0005)	0,001 *
Zn	2,850 (2,030—3,130)	1,980 (1,580—3,020)	0,170
Ретроперитонеальная жировая ткань			
Co	0,0010 (0,0007—0,0010)	0,0004 (0,0004—0,0009)	0,018 *
Cr	0,030 (0,010—0,030)	0,010 (0,007—0,010)	0,032 *
Cu	0,340 (0,270—0,380)	0,215 (0,200—0,240)	0,003 *
Fe	4,050(3,480—5,900)	3,165 (2,710—3,810)	0,113
I	0,040 (0,030—0,050)	0,020 (0,009—0,040)	0,049 *
Mn	0,050 (0,040—0,060)	0,040 (0,030—0,050)	0,159
Se	0,130 (0,004—0,230)	0,130 (0,004—0,140)	0,549
V	0,0008 (0,0006—0,0010)	0,0005 (0,0004—0,0007)	0,006 *
Zn	2,890 (2,020—3,180)	1,830 (1,570—2,660)	0,170

Примечание. Данные представлены как медиана и величины 25—75 перцентилей; * — достоверность различий $p < 0,05$ в соответствии с U-тестом Манн—Уитни

Таким образом, месячный курс ВЖД у молодых крыс Wistar сопровождается морфологическими признаками ожирения без увеличения массы тела, формирования инсулинорезистентности и атерогенных изменений. Гипотетически, наблюдаемая ситуация характерна для ранних стадий развития ожирения.

Обращает на себя внимание, что, несмотря на отсутствие существенных изменений в сывороточных маркерах инсулинорезистентности и дислипидемии, ВЖД у молодых животных значительно изменяли микроэлементный статус. В частности, наиболее заметные изменения были обнаружены в уровнях Cu, Cr, I, V и Se. Следует отметить, что выявленное значительное уменьшение содержания меди в организме под влиянием ВЖД согласуются с данными литературы [13]. При этом данных о содержании Cu в жировой ткани в ответ на ВЖД недостаточно. В частности, в предыдущем исследовании, мы не смогли обнаружить значимое уменьшение содержания меди в жировой ткани у взрослых самок крыс, находящихся на ВЖД в течение 3 мес. [14]. Предположительно, индуцированный диетой дефицит меди может развиваться вследствие нарушения экспрессии мРНК дуоденального транспортера меди (CTR1) [13]. Учитывая роль данного металла в функционировании антиоксидантной системы [15], развитие окислительного стресса при ожирении также гипотетически может сопровождаться снижением уровня меди в организме. Уменьшение содержания Cr и V в жировой ткани согласуется с нашими предыдущими наблюдениями и также указывает на значительную связь между ВЖД-индуцированным снижением Cr и V и биохимическими изменениями, характерными для метаболического синдрома [16]. Принимая во внимание роль хрома [17] и ванадия [18] в передаче сигнала инсулина, можно предположить, что снижение уровня Cr и V в адипоцитах может, по крайней мере, частично, опосредовать связанную с ожирением инсулинорезистентность [19]. Следует отметить, что в данной модели алиментарного ожирения мы наблюдали микроэлементный дисбаланс в жировой ткани без каких-либо других ассоциированных с ожирением нарушений обмена веществ. Таким образом, полученные данные могут указывать на то, что изменения микроэлементного статуса могут предшествовать более общим метаболическим нарушениям.

Безусловно, наблюдаемое значительное снижение уровня Se в печени и шерсти экспериментальных животных является признаком его хронического дефицита. Так как развитие ожирения связано с окислительным стрессом [9], можно предположить, что лица с ожирением предъявляют повышенные требования в селене, что характерно для прооксидантного состояния [20]. Так, к примеру, фруктозо-индуцированный

метаболический синдром сопровождался значительным снижением селена в печени [21]. Интересен факт значительного снижения содержания йода у ВЖД животных. Эти данные, в целом, согласуются с более ранними исследованиями, указывающими на статистически значимую связь между ожирением и дисфункцией щитовидной железы [22]. Значительное индуцированное диетой изменение уровня Zn наблюдалось только в печени и, в меньшей степени, в жировой ткани, что согласуется с ранее полученными данными [23, 24].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о значительном индуцированном диетой снижении содержания микроэлементов в печени, жировой ткани, сыворотке и шерсти с наиболее выраженными изменениями в обмене Cu, Cr, I, V и Se. Насколько нам известно, это первое сообщение об индуцированных диетой изменениях содержания микроэлементов в тканях животных с алиментарной моделью ожирения без таких ассоциированных ожирением метаболических нарушений, как инсулинорезистентность и атерогенная дислипидемия.

References

1. *World Health Organization. (2015). Obesity and overweight. Fact sheet N 311. Updated January 2015*
2. Han J.C., Lawlor D.A., Kimm S.Y. Childhood obesity. *The Lancet*. 2010; 375(9727): 1737-48.
3. Fraga C.G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol. Aspects Med.* 2005; 26(4): 235-44.
4. Wiernsperger N., Rapin J. Trace elements in glucometabolic disorders: an update. *Diabetol. Metab. Syndr.* 2010; 2(70): 1-9.
5. Nikonov A.A., Skalnaya M.G., Tinkov A.A., Skalny A.V. Mutual interaction between iron homeostasis and obesity pathogenesis. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2015; 30: 207-214.
6. Wojciak R.W., Mojs E., Stanislawska-Kubiak M. Comparison of the hair metals in obese children according to slim therapy. *Trace Elem. Electroly.* 2010; 27(4).
7. Tuzcu M., Sahin N., Orhan C., Agca C.A., Akdemir F., Tuzcu Z. et al. Impact of chromium histidinate on high fat diet induced obesity in rats. *Nutr. Metab.* 2011; 8(1): 1.
8. Emoto M., Nishizawa Y., Maekawa K., Hiura Y., Kanda H., Kawagishi T. et al. Homeostasis model assessment as a clinical index of insulin resistance in type 2 diabetic patients treated with sulfonylureas. *Diabetes Care.* 1999; 22(5): 818-22
9. Maury E., Bricard S.M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010; 314(1): 1-16.
10. Cottart C.H., Bonvin E., Rey C., Wendum D., Bernaudin J.F., Dumont S. et al. (2007). Impact of nutrition on phenotype in CFTR-deficient mice. *Pediatr. Res.* 2007; 62(5): 528-532.
11. Rodina A.V., Severin S.E. The role of adiponectin in the pathogenesis of the metabolic syndrome and approach to therapy. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2013; 1: 15-26. (in Russian)

12. Do G.M., Oh H.Y., Kwon E.Y., Cho Y.Y., Shin S.K., Park H.J. et al. Lon-gterm adaptation of global transcription and metabolism in the liver of hig-hfat die-tfed C57BL/6J mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011; 55(S2): S173-S185.
13. Song M., Schuschke D.A., Zhou Z., Chen T., Pierce W.M., Wang R. et al. High fructose feeding induces copper deficiency in Sprague-Dawley rats: a novel mechanism for obesity related fatty liver. *J. Hepatol.* 2012; 56(2): 433-440.
14. Tinkov A.A., Polyakova V.S., Nikonorov A.A. Chronic administration of iron and copper potentiates adipogenic effect of high fat diet in Wistar rats. *Biometals.* 2013; 26: 447-463.
15. Lysko A.I., Dudchenko A.M. Catalytic antioxidants as potential therapeutic agents for correction of the pathologies caused by oxidative stress. *Patogenez.* 2013; 11(3): 22-8. (in Russian)
16. Tinkov A.A., Popova E.V., Polyakova, V.S., Kwan O.V., Skalny A.V., Nikonorov A.A. Adipose tissue chromium and vanadium disbalance in high-fat fed Wistar rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2015; 29: 176-181.
17. Hua Y., Clark S., Ren J., Sreejayan N. (2012). Molecular mechanisms of chromium in alleviating insulin resistance. *J. Nutr. Biochem.* 2012; 23(4): 313-9.
18. Srivastava A.K., Mehdi M.Z. Insuli-nomimetic and ant-idiabetic effects of vanadium compounds. *Diabetic Med.* 2005; 22(1): 2-13.
19. Tinkov A.A., Sinitskii A.I., Popova E.V., Nemereshina O.N., Gatiatulina E. R., Skalnaya M.G. et al. Alteration of local adipose tissue trace element homeostasis as a possible mechanism of obesity-related insulin resistance. *Med. Hypotheses.* 2015; 85(3): 343-7.
20. Thomson C.D. (2004). Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2004; 58(3): 391-402.
21. Ramadan K.S., Yousef J.M., Hamza A.H., Abdel S.E. Antioxidant and Protective Effects of Selenium against Metabolic Syndrome Induced by High Fructose in Rats. *IJAST.* 2013; 3(5): 45-54
22. Biondi B. Thyroid and obesity: an intriguing relationship. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010; 95(8): 3614-7.
23. Tallman D.L., Noto A. D., Taylor C.G. Low and high fat diets inconsistently induce obesity in C57BL/6J mice and obesity compromises n-3 fatty acid status. *Lipids.* 2009; 44(7): 577-80.
24. Tinkov A.A., Popova E.V., Gatiatulina E.R., Skalnaya A.A., Yakovenko E.N., Alchinova I.B., Karganov M.Y., Skalny AV., Nikonorov A.A. Decreased adipose tissue zinc content is associated with metabolic parameters in high fat fed Wistar rats. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 2016; 15(1): 99-105.

Сведения об авторах:

Гатиатулина Евгения Рамильевна, ассистент каф. биологической химии ГБОУ ВПО ОрГМУ Минздрава России; ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России

Попова Елизавета Васильевна, канд. мед. наук, доцент каф. биологической химии ГБОУ ВПО ОрГМУ Минздрава России

Полякова Валентина Сергеевна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической анатомии ГБОУ ВПО ОрГМУ Минздрава России

Скальная Анастасия Анатольевна, студент, ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова

Аглетдинов Эдуард Феликсович, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России

Никоноров Александр Александрович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. биологической химии ГБОУ ВПО ОрГМА Минздрава РФ; ст. науч. сотр. Института биоэлементологии ФГБОУ ВО ОГУ

Радыш Иван Васильевич, доктор мед. наук, зав. каф. управления сестринской деятельностью Медицинский институт ФГБОУ ВПО РУДН

Карганов Михаил Юрьевич, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП

Скальный Анатолий Викторович, директор Института биоэлементологии ФГБОУ ВО ОГУ; зав. лаб. ГБОУ ВПО ЯрГУ им. П. Г. Демидова; вед. исследователь ФГБНУ ВИЛАР; зав. каф. медицинской элементологии, Медицинский институт ФГБОУ ВПО РУДН

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616-006.04:616-084+577.1

Генинг Т.П., Долгова Д.Р., Абакумова Т.В., Антонеева И.И., Насырова Е.Ю., Генинг С.О.

Влияние аутогемохимиотерапии по схеме САР на редоксзависимые процессы в эритроцитах организма-опухоленосителя при экспериментальном раке яичников

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», 432017, г.Ульяновск, ул. Льва Толстого, д. 42

Цель исследования — изучение влияния аутогемохимиотерапии по схеме САР на редокс-зависимые процессы в эритроцитах организма-опухоленосителя при экспериментальном раке яичников. **Методика.** Рассматривается динамика редокс-зависимых процессов в эритроцитах крыс с экспериментальной асцитной опухолью яичников на фоне аутогемохимиотерапии по схеме САР (доксорубин + циклофосфан + цисплатин). В эритроцитах биохимически оценивали показатели окислительной модификации белков — карбонильные производные при $\lambda = 346$ нм, 370 нм, 430 нм и 530 нм, параметры перекисного окисления липидов — малоновый диальдегид, кетодиены, диеновые конъюгаты, шиффовы основания; ферментативное звено антиоксидантной системы: активность каталазы, глутатион-трансферазы и супероксиддисмутазы. **Результаты.** В эритроцитах животных-опухоленосителей было установлено повышение продуктов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков при одновременном снижении активности антиоксидантных ферментов, что позволяет предполагать состояние оксидативного и карбонильного стресса. **Заключение.** Показано, что экстракорпоральное инкубирование цитостатиков, (схема САР), с аутокровью перед введением (метод аутогемохимиотерапии), как при моноведении химиопрепаратов, так и при введении по схеме САР снижает в эритроцитах циркулирующей крови уровень продуктов перекисного окисления липидов, окислительной модификации белков и повышает активность ферментов первой линии антиоксидантной защиты — каталазы и супероксиддисмутазы. Подобная динамика редокс-зависимых процессов позволяет предполагать стабилизирующее влияние аутогемохимиотерапии на эритроциты циркулирующей крови организма-опухоленосителя.

Ключевые слова: асцитная опухоль яичников; аутогемохимиотерапия; эритроциты, редокс-зависимые процессы.

Для цитирования: Генинг Т.П., Долгова Д.Р., Абакумова Т.В., Антонеева И.И., Насырова Е.Ю., Генинг С.О. Влияние аутогемохимиотерапии по схеме САР на редоксзависимые процессы в эритроцитах организма-опухоленосителя при экспериментальном раке яичников. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 86—92.

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

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 07.12.2015

Gening T.P., Dolgova D.R., Abakumova T.V., Antonееva I.I., Nasyrova E.Yu., Gening S.O.

Effects of CAR-regimen autochemotherapy on redox-dependent processes in erythrocytes of tumor-bearing organism in experimental ovarian cancer

Ulyanovsk State University, 42, Leo Tolstoy Str., Ulyanovsk, 432017

The purpose of the study was to investigate the effect of the scheme autochemotherapy ATS on redox-dependent processes in red blood cells of tumor-bearing organism at an experimental ovarian cancer. **Methods.** We studied the dynamics of redox-dependent processes in red blood cells of rats with experimental ascitic ovarian tumor during CAP-regimen autochemotherapy (cyclophosphamide, doxorubicin and cisplatin). We assessed the indicators of oxidative modification of proteins in erythrocytes — carbonyl derivatives at $\lambda = 346$ nm, 370 nm, 430 nm and 530 nm, the parameters of lipid peroxidation — malondialdehyde, ketodienes, diene conjugates, Schiff bases; the enzymatic part of antioxidant system — the activity of catalase, glutathione transferase and superoxide dismutase biochemically. **Results.** The red blood cells of tumor-bearing animals were found having increased the products of lipid peroxidation and oxidative modification of proteins while reducing the activity of antioxidant enzymes, suggesting a state of oxidative and carbonyl stress. **Conclusion.** We showed that extracorporeal incubation of cytotoxic drugs used in the CAP scheme with autoblood prior to infusion — the

method of autochemotherapy — either in monochemotherapy, or in CAP-regimen, decreases the levels of lipid peroxidation, oxidative modification of proteins and increases activity of first line antioxidant defense enzymes — catalase and superoxide dismutase in circulating red blood cells. Such dynamics of redox-dependent processes suggests a stabilizing effect of autochemotherapy on circulating erythrocytes in a tumor-bearing organism.

Keywords: ascitic ovarian tumor; autochemotherapy; erythrocytes; redox-dependent processes.

For citation: Gening T.P., Dolgova D.R., Abakumova T.V., Antoneeva I.I., Nasyrova E.Yu., Gening S.O. Effects of CAP-regimen autochemotherapy on redox-dependent processes in erythrocytes of tumor-bearing organism in experimental ovarian cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (4): 86–92. (in Russ.).

For correspondence: Tatyana P. Gening, Doctor of Biological Sciences, Head of Department of Physiology and Pathophysiology of Ulyanovsk State University; 2, Arc.Livchak Str., Ulyanovsk, Russian Federation, 432017, e-mail: Naum-53@yandex.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Gening T.P., <http://orcid.org/0000-0002-5117-1382>

Dolgova D.R., <http://orcid.org/0000-0001-5475-7031>

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

Antoneeva I.I., <http://orcid.org/0000-0002-1525-2070>

Nasyrova E.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-0951-744X>

Gening S.O., <http://orcid.org/0000-0001-6970-6659>

Received 07.12.2015

Введение

Рак яичников (РЯ) — пятая по частоте причина смерти от злокачественных новообразований у женщин [1]. Пятилетняя выживаемость больных РЯ не превышает 37,6% [2].

В России ежегодно регистрируется 13,2 тыс. опухолей яичников и 7,7 тыс. летальных исходов. В 60,8% случаев диагностируется распространенная (III—IV) стадия заболевания [3]. Химиотерапия является вторым основным компонентом лечения РЯ [4—6]. На поздних стадиях РЯ химиотерапия может применяться самостоятельно, у целого ряда больных она становится главным методом лечения, способным задержать развитие опухоли. По данным литературы, около 30% больных получают терапию только цитостатиками [7]. Системная лекарственная терапия является неотъемлемой составной частью лечебного процесса для подавляющего большинства пациенток с РЯ [8, 9]. Особое место в лечении РЯ принадлежит препаратам платины и таксанам [10, 11]. С середины 90-х годов в США и ряде стран Европы при РЯ используют схему CAP. Комбинированная химиотерапия по этой схеме проводится после радикальных операций при Ib, Ic, III и IV стадиях РЯ больным с остаточными опухолями и метастазами. Эту же схему используют в качестве первоначального лечения при неоперабельных опухолях. Эту схему химиотерапии применяют также в качестве профилактической меры при РЯ ранних стадий при неуверенности в радикальности опера-

ции. Однако лечение цитостатиками РЯ в 25% случаев прекращают из-за развития выраженных побочных эффектов [12].

Метод аутогемохимиотерапии (АГХТ) предусматривает реинфузию клеток крови после их инкубации с лекарственными средствами. Установлено, что инкубация цитостатика с аутокровью приводит к образованию качественно новых противоопухолевых соединений: цитостатик — форменный элемент и цитостатик — белок. При этом в несколько раз возрастает время циркуляции в крови химиопрепарата, который активизируется на поверхности клеток и усиливается биотрансформация препарата. Это объясняет низкую дозозависимую токсичность и выраженную противоопухолевую эффективность АГХТ по сравнению с полихимиотерапией на традиционных растворителях [13]. Кроме того, АГХТ обладает иммунопротекторным действием, активизирует антистрессорные адаптационные реакции и повышает общую неспецифическую резистентность организма [13].

В то же время, *in vitro* при инкубации крови больных с рецидивами рака шейки матки с циклофосфаном и цисплатином (препаратами, входящими в схему CAP при полихимиотерапии РЯ), было обнаружено, что преимущественное связывание химиопрепаратов происходит с мембранами эритроцитов, вероятно, путем встраивания в область липидного бислоя [14]. Роль активации свободнорадикальных процессов в изменении морфофункционального состояния эритроцитов при этом остается спорной.

Цель исследования — изучение влияния АГХТ по схеме САР на редокс-зависимые процессы в эритроцитах организма-опухоленосителя при экспериментальном РЯ.

Методика

Исследования проведены на белых беспородных крысах массой 180—200 г. Модель рака яичников воспроизводили путем перевивки опухолевого штамма (НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАН, г. Москва). Трансплантируемая асцитная опухоль яичника (АОЯ) была получена Е.Е. Погосянц, Е.Л. Пригожиной и Н.Л. Еголиной в 1958 г. Исходный гистологический тип опухоли — метастазирующая папиллярная аденокарцинома, в настоящее время — асцитная опухоль. После предварительного пассажа на 8-е сут. после внутрибрюшинной перевивки опухоли от одной из крыс была взята асцитическая жидкость и перевита животным экспериментальной группы в объеме 0,5 мл инокулята (асцитическая жидкость с 7×10^7 опухолевых клеток в каждой дозе) + 0,5 мл питательной среды 199 на 100 г массы животного. Прогрессирование данного типа опухоли проходит в 3 фазы: логарифмическая (с 4-х сут. после перевивки), стационарная (с 8-х сут. после перевивки) и терминальная стадия (с 13-х сут. после перевивки). Все животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и корму. Соблюдались правила гуманного обращения

с животными, регламентированные «Правилами проведения работ и использования экспериментальных животных», утвержденными Приказом МЗ СССР № 755 от 12 августа 1977 г., положениями Хельсинской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации от 1964 г., дополненной в 1975, 1983 и 1989 гг., а также требованиями этического комитета Института медицины, экологии и физической культуры Ульяновского государственного университета. Для получения биоматериала животных декапитировали под эфирным наркозом. Доза для введения цитостатиков рассчитывалась по номограмме на m^2 поверхности тела животного [15] и составила для доxorубина 40 мг/ m^2 , для циклофосфана 600 мг/ m^2 , для цисплатина 75 мг/ m^2 . При совместном введении цитостатиков по схеме САР использовали концентрации вдвое меньше указанных. Введение цитостатиков животным с РЯ проводили на 5-е сут. после перевивки (логарифмическая стадия развития опухоли). 1 мл крови крысы из хвостовой вены смешивали с 0,35 мл гемокона и дозой химиопрепарата и инкубировали 30 мин при 37°C. Смесь вводили в боковую вену хвоста животного.

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в эритроцитах оценивали по уровню диеновых конъюгатов (ДК), кетодиенов (КД), шиффовых оснований (ШО) по интенсивности поглощения при длинах волн соответственно 232, 278 и 400 нм в гептановом экстракте по методу Волчегорского И.А. (1989). Уровень малонового диальдегида (МДА) определяли

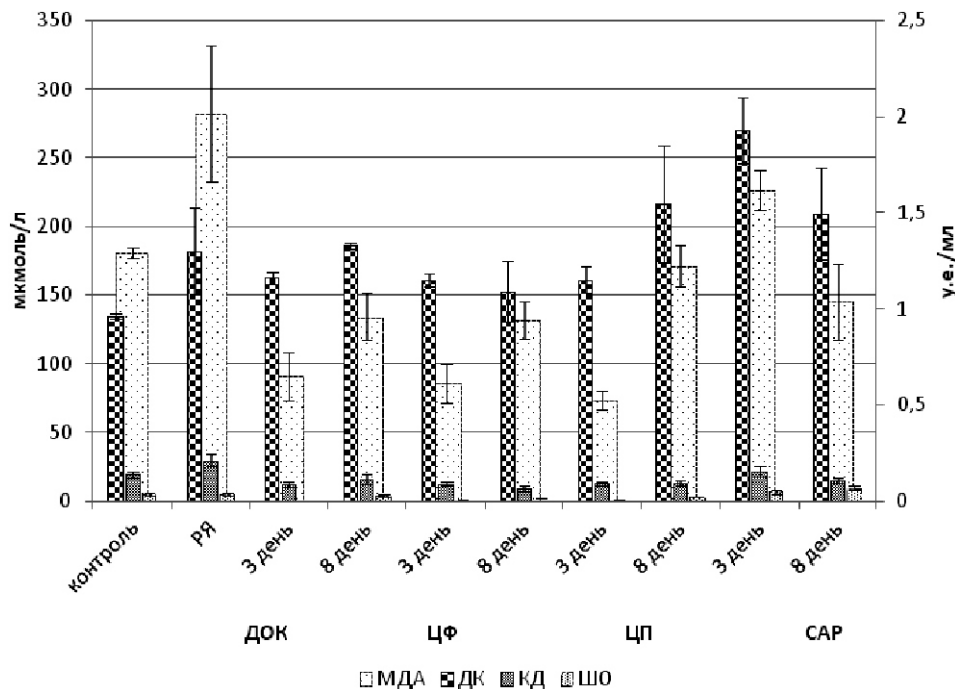


Рис. 1. Уровень продуктов ПОЛ в эритроцитах крыс с АОЯ после АГХТ.

в тесте с тиобарбитуровой кислотой по методу Андреевой Л.И. и др. (1988). Содержание продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) оценивали при 346 нм, 370 нм, 430 нм, 530 нм по методу Levina R.L. (1990) в модификации Дубининой Е.Е. (2000). Активность СОД оценивали по способности конкурировать с нитросиним тетразолием (НСТ) за супероксидный анион по методу Nishikimi M. (1972). Активность каталазы оценивали по определению скорости утилизации H_2O_2 по методу Карпищенко А.И. (1999). Активность ГТ оценивали по скорости ферментативного образования GS-2,4-динитробензола в катализируемой ферментом реакции восстановления глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом. Исследования проводили на 3-и и 8-е сут. после проведения АГХТ и моноведения цитостатиков. В каждой экспериментальной группе было по 12 животных, в контрольной группе и в экспериментальной группе с раком яичников по 24 животных. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни (Stata 6.0) и стандартных пакетов «Microsoft Excel», 2007. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$ от уровня контрольной серии.

Результаты и обсуждение

В эритроцитах животных с АОЯ установлено статистически значимое возрастание продуктов ПОЛ по сравнению с контролем (рис. 1). При этом уровень МДА составил $281,8 \pm 49,6$ мкмоль/л против $180,7 \pm 3,6$ мкмоль/л в контроле), уровень ДК $1,3 \pm 0,2$ у.е./мл против $0,96 \pm 0,01$ у.е./мл в контроле) и уровень КД $0,21 \pm 0,03$ у.е./мл против

$0,14 \pm 0,02$ у.е./мл в контроле. На фоне активации ПОЛ имело место статистически значимое и резкое снижение активности антиоксидантных ферментов (таблица).

Полученные данные согласуются с данными литературы, согласно которым, на фоне роста опухоли в организме снижается активность антиоксидантных ферментов первой линии защиты — СОД, каталазы и ГП [16, 17]. Авторы полагают, что гипогликемическое действие опухоли активирует метаболизм жирных кислот. Использование последних в качестве источника энергии и развивающаяся в организме-опухоленосителя тканевая гипоксия приводит к активации ПОЛ. Также считается установленным, что при использовании цитостатиков усиливается дефицит антиоксидантных ферментов, определяющий истощение механизмов антиоксидантной защиты.

Усиление ПОЛ при одновременном снижении АОС позволяет предполагать развитие в эритроцитах оксидативного стресса. Одновременно в эритроцитах на фоне развития опухоли статистически значимо возрастает количество продуктов ОМБ (рис. 2). Так, содержание альдегидных и кетонных групп нейтрального характера составило соответственно при $\lambda = 346$ нм $0,651 \pm 0,059$ ед. опт.пл./мг белка против $0,353 \pm 0,040$ ед. опт.пл./мг белка в контроле; при $\lambda = 370$ нм $0,811 \pm 0,031$ ед. опт.пл./мг белка против $0,502 \pm 0,008$ ед. опт.пл./мг белка в контроле. Содержание карбонильных производных основного характера составило при $\lambda = 430$ нм $0,427 \pm 0,099$ ед. опт.пл./мг белка против $0,316 \pm 0,002$ ед. опт.пл./мг белка и при $\lambda = 530$ нм соответственно $0,161 \pm 0,037$ ед. опт.пл./мг белка про-

Таблица

Параметры компонентов системы ПОЛ-АО и продуктов ОМБ в эритроцитах крыс с АОЯ на фоне АГХТ при моноведении химиопрепаратов и введении по схеме CAP

Группа		Показатель		
		ГТ, мкмоль/мин/л	Каталаза, ммоль/мин/л	СОД, у.е./л
Контроль, n = 24		$0,54 \pm 0,04$	$6,12 \pm 0,07$	$4,04 \pm 0,36$
РЯ, n = 24		$0,14 \pm 0,02^{**}$	$0,94 \pm 0,03^{**}$	$0,64 \pm 0,09^{**}$
ДОК	3 день, n = 12	$0,15 \pm 0,02^*$	$2,99 \pm 0,08$	$1,348 \pm 0,11^*$
	8 день, n = 12	$0,063 \pm 0,002^*$	$2,54 \pm 0,04$	$0,92 \pm 0,01^*$
ЦФ	3 день, n = 12	$0,14 \pm 0,0141$	$3,04 \pm 0,40^*$	$2,36 \pm 0,18^*$
	8 день, n = 12	$0,04 \pm 0,01$	$0,96 \pm 0,03^*$	$0,95 \pm 0,06^*$
ЦП	3 день, n = 12	$0,18 \pm 0,02^*$	$3,57 \pm 0,24^*$	$1,67 \pm 0,08^*$
	8 день, n = 12	$0,11 \pm 0,01^*$	$2,80 \pm 0,07^*$	$0,93 \pm 0,11^*$
CAP	3 день, n = 12	$0,09 \pm 0,01^*$	$3,88 \pm 0,19^*$	$0,96 \pm 0,13$
	8 день, n = 12	$0,09 \pm 0,01^*$	$2,84 \pm 0,37$	$0,95 \pm 0,03$

Примечание. * — статистически значимые изменения по сравнению со значениями до АГХТ (непараметрическая статистика, критерий Вилконсона (парный)); ** — статистически значимые изменения по сравнению с контролем.

тив $0,049 \pm 0,003$ ед.опт.пл./мг белка в контроле. Подобное повышение уровня продуктов ОМБ свидетельствует о возникновении карбонильного стресса.

Следующим этапом работы была оценка уровня продуктов ПОЛ, ОМБ и активности антиоксидантных ферментов в эритроцитах крыс с АОЯ на фоне АГХТ при моноведении химиопрепаратов и введении их по схеме САР.

По данным литературы, усиление редокс-зависимой модификации белков имеет место при различных патологических состояниях, в том числе, при возникновении и развитии неоплазмы [18, 19]. Соответственно, повышение уровня карбонильных групп окислительных белков признается наиболее перспективным маркером интенсивности свободнорадикальных процессов [20]. Причиной повышения уровня продуктов ОМБ при этом может быть не только постраниционная окислительная модификация, но и уровень их протеолитической деструкции.

В результате исследований установлено выраженное снижение всех исследуемых показателей ОМБ, что имело место при монотерапии и при введении по схеме САР на 8-е сут. после введения (рис. 2). При этом при АГХТ с ДОК и с ЦФ они были даже ниже контрольных. При АГХТ по схеме САР уровни продуктов ОМБ были статистически значимо ниже таковых до введения химиопрепаратов (при $\lambda = 346$ нм это

составило $0,376 \pm 0,018$ ед.опт.пл./мг белка против $0,651 \pm 0,059$ ед.опт.пл./мг белка; при $\lambda = 370$ нм $0,377 \pm 0,091$ ед.опт.пл./мг белка против $0,811 \pm 0,031$ ед.опт.пл./мг белка; при $\lambda = 430$ нм $0,185 \pm 0,030$ ед.опт.пл./мг белка против $0,427 \pm 0,099$ ед.опт.пл./мг белка и при $\lambda = 530$ нм $0,080 \pm 0,003$ ед.опт.пл./мг белка против $0,161 \pm 0,037$ ед.опт.пл./мг белка).

Исследованиями ряда авторов показано, что во время инкубации с кровью химиопрепаратов, используемых в схеме САР, происходит их связывание с эритроцитами [21]. Установлено изменение различных компонентов клеточной мембраны эритроцитов, связавших химиопрепарат [22]. В результате происходят конформационные изменения белковых молекул, образуются и секвестрируются комплексы антигенов. Показано, что связывание химиопрепарата с эритроцитами снижает вероятность токсического влияния на лейкопоз, поражения легких и печени. Однако, отсутствуют данные о влиянии АГХТ на функциональное состояние циркулирующих эритроцитов. На основании полученных данных мы можем констатировать статистически значимое снижение окислительной модификации белков и отсутствие карбонильного стресса в эритроцитах крыс с АОЯ на фоне АГХТ. Анализ параметров ПОЛ в эритроцитах крыс с АОЯ после АГХТ свидетельствует о сни-

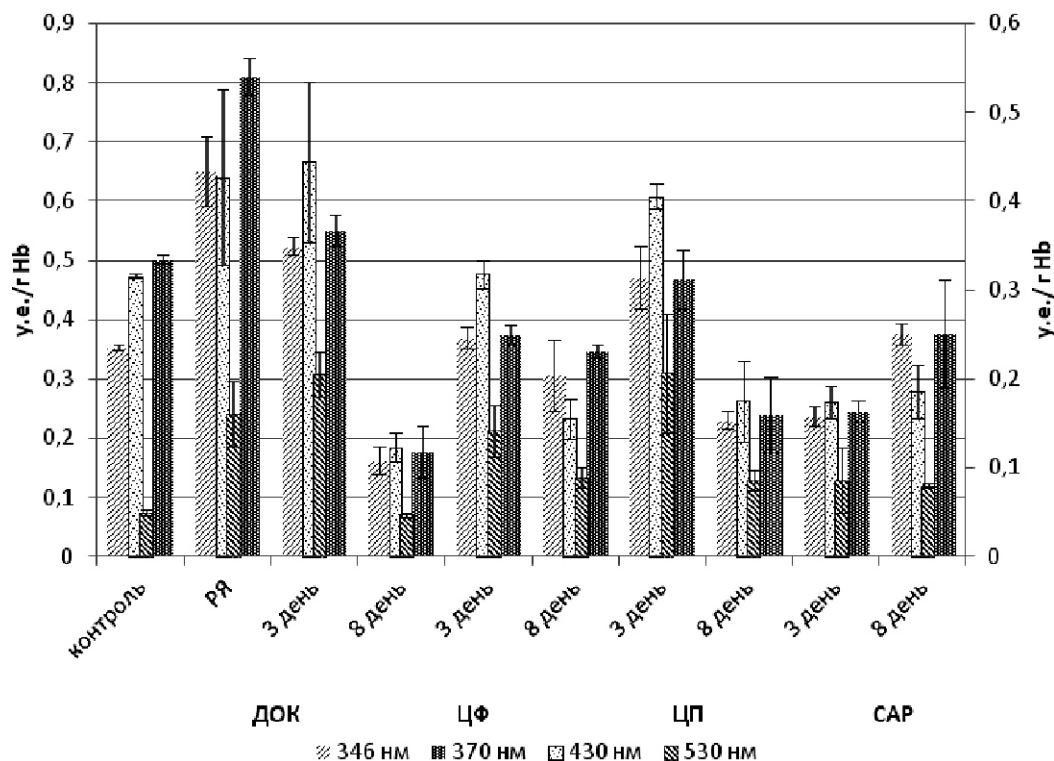


Рис. 2. Уровень продуктов ОМБ в эритроцитах крыс с АОЯ после АГХТ.

жении уровня МДА, КД, ДК и ШО через 3 и 8 сут. после моноведения всех трех цитостатиков (рис. 1). При одновременном введении химиопрепаратов по схеме САР на всех сроках после введения статистически значимо снижался уровень МДА ($226,595 \pm 14,745$ мкмоль/л через 3 сут. после введения цитостатиков и $145,370 \pm 27,814$ мкмоль/л через 8 сут. после введения цитостатиков против $281,847 \pm 49,648$ мкмоль/л до введения). На сегодня считается доказанным, что препараты, используемые в химиотерапии по схеме САР, инициируют оксидативный стресс. Ранее, в наших исследованиях было показано значимое возрастание уровня МДА, КД и ШО в эритроцитах при традиционной полихимиотерапии по схеме САР у больных РЯ [23]. В то же время работами ряда авторов *in vitro* показано, что при инкубации исследованных цитостатиков с кровью большинство структурных характеристик эритроцитов оставалось в пределах нормы. Наблюдаемое снижение текучести мембран эритроцитов, как полагают авторы, происходит не за счет активации свободнорадикальных процессов, а за счет встраивания цитостатиков в липидный бислой мембраны [17].

Наблюдаемое отсутствие выраженной активации свободнорадикальных процессов перекисного окисления в циркулирующих эритроцитах при АГХТ в определенной степени может объясняться депонированием препарата клетками крови в процессе предварительной инкубации.

При оценке активности антиоксидантных ферментов в эритроцитах крыс с АОЯ после АГХТ установлено статистически значимое снижение ГТ по сравнению с активностью как до моноведения химиопрепаратов, так и до введения по схеме САР (таблица). Активность СОД и каталазы резко снижены по сравнению с нормой у крыс с АОЯ, на фоне АГХТ повышается как при монотерапии, так и при введении химиопрепаратов по схеме САР. Подобная динамика позволяет предполагать восстановление антиоксидантной емкости эритроцитов на фоне АГХТ.

Таким образом, в эритроцитах периферической крови крыс с АОЯ развивается состояние карбонильного и оксидативного стресса. Использование цитостатиков после предварительного экстракорпорального инкубирования с аутокровью, — метод АГХТ, — как при моноведении, так и при введении по схеме САР значимо снижает уровень продуктов ОМБ, продуктов ПОЛ и повышает активность каталазы и СОД — ферментов первой линии антиоксидантной защиты, что позволяет предполагать стабилизирующее влияние АГХТ на эритроциты периферической крови животного-опухоленосителя.

References

1. Pisani P., Bray F., Parkin D.M. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer*. 2002; 97 (1): 72-81.
2. De Angelis R., Sant M., Coleman M.P., Francisci S., Baili P., Pierannunzio D., et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO-CARE-S-a population-based study. *Janel Oncol*. 2013; 2045(13): 1-12.
3. *Malignancies in Russia in 2012 (morbidity and mortality) [Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2012 godu (zabolevaemost' i smertnost')]*. Ed. A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrov: Moscow; 2014. (in Russian)
4. Pokatayev I.A., Stenina M.B., Chitia L.V., Zhordania K.I., Tyuljandin S.A. Retrospective analysis of chemotherapy efficacy in platinum-resistant and platinum-refractory ovarian cancer. *Vestnik RONTs im. N.N. Blohina RAMN*. 2009; 20(2): 34-9.
5. Mehta D.A. Hay J.W. Cost-effectiveness of adding bevacizumab to first line therapy for patients with advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2014; 132(3): 677-83.
6. Markman M., Bookman M.A. Second-line treatment of ovarian cancer. *Oncologist*. 2000; 5(1): 26-35.
7. Ozols R.F. *Ovarian cancer: Current Status and Future Directions*. In: «Progress in Anti-Cancer Chemotherapy». Ed by D. Khayat and G.N. Hortobagye. Springer — Verlage France 2000. pp. 135-144.
8. Adam H., Hug S., Bosshard G. Chemotherapy near the end of life: a retrospective single-centre analysis of patients' charts. *BMC Palliat Care*. 2014; 13: 26.
9. Cherenkov V.G., Petrov A.B., Shpenkova A.A., Vasil'eva T.M. Use of Reamberin for the prevention of adverse effects of combined antineoplastic agents in stage III-IV ovarian cancer during induction treatment. *Voprosy onkologii*. 2012; 58(1): 110-4. (in Russian)
10. Engelholm S., Hovarth G., Reverseschedule oral topotecan, paclitaxel and carboplatin in primary advanced ovarian cancer: Aphase I doserandng study. *Ann. Oncol*. 2000; 2(4): 81.
11. Bolis G., Scarfone G., Sciatta C. Phase II study of topotecan, carboplatin and paclitaxel as front line treatment in suboptimal advanced epithelial ovarian cancer (AEOC). *Proc. ASCO*. 2000: 1543.
12. Korman D.B. *Fundamentals of anticancer chemotherapy [Osnovy protivopukholevoy khimioterapii]*. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2006. (in Russian)
13. Sidorenko Yu.S. In vitro incubation of cytostatics in the natural environment of the organism new methods for efficient and gentle cancer chemotherapy. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal*. 2004; 2-3: 35-9. (in Russian)
14. Shalashny E.V., Goroshinskaya I.A., Nerodo G.A., Guskov E.A., Surikov E.I., Nemashkalova L.A., et al. Investigation of the effect of chemotherapy on the level of endogenous intoxication, intensity free radical oxidation and membrane apparatus of cells of the blood of patients with recurrent cervical cancer in experiments in vitro. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal*. 2008; 2 (26): 50-4. (in Russian)
15. *Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances [Rukovodstvo po jeksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novyh farmakologicheskikh veshhestv]*. Ed. R.U. Khabriev. M.: Meditsina, 2005. (in Russian)
16. Looi M.L., Mohd Dali A.Z., Md Ali S.A., Wan Ngah W.Z., Mohd Yusof Y.A. *Eur J Cancer Prev*. 2008; 17(6): 555-60.

17. Rajneesh C.P., Manimaran A., Sasikala K.R., Adai-kappan P. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. 2008; 49(8): 640-3.

18. Antoneeva I.I., Dolgova D.R., Gening T.P., Abakumova T.V., Gening S.O., Pirmamedova S.S., Fomina A.V., Mikheenko A.A. Effects of CAP-regimen Chemotherapy on Blood Redox Status in Patients with Ovarian Cancer. 2015; May 25.

19. Kondo S., Toyokuni S., Iwasa Y., Tanaka T., Onodera H., Hiai H., Imamura M. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27(3-4): 401-10.

20. Dubinina E.E. *Products of metabolism of oxygen in the functional activity of cells (life and death, creation and destruction). Physiological and clinical and biochemical processes. [Produkty metabolizma kisloroda v funkcional'noy aktivnosti kletok: (zhizn' i smert', sozidanie i razrushenie). Fiziologicheskie i kliniko-biokhimicheskie protsessy].* Sankt-Peterburg: «Med. Pressa», 2006. (in Russian)

21. Soldatkina N.V., Goroshinskaya I.A., Bordyushkov Yu.N., Rovda T.A., Kirsanova L.D. *Influence of experi-*

mental chemotherapy on the intensity of free radical processes of lipid peroxidation in rat blood. Final scientific research of the last years of the XX century [Vliyanie eksperimental'noy himioterapii na intensivnost' svobodnoradikal'nykh protsessov perekisnogo okisleniya lipidov v krovi krysa. Itogovye nauchnye izyskaniya poslednego goda XX veka]. Rostov-na-Donu, 2000. 281-4. (in Russian)

22. Popov I.L., Verkhovtseva A.I. *The method of separation autochemotherapy in the combined treatment of patients with generalized forms of Hodgkin's disease [Metod razdelennoy augogemokhimioterapii v kombinirovannom lechenii bol'nykh generalizovannymi formami limfogranulematoza].* V kn. *Vysokie medicinskie tehnologii v luchevoj terapii zlokachestvennykh opuholey.* Rostov-na-Donu, 1999. (in Russian)

23. Gening T.P., Abakumova T.V., Dolgova D.R., Antoneeva I.I., Gening S.O., Pirmamedova S.S., Fomina A.V., Vasil'eva E.V. Redox-dependent processes in blood plasma, neutrophils and erythrocytes of patients with ovary cancer after polychemotherapy by CAP scheme. *Antibiotiki i khimioterapiya.* 2014; 59(5-6): 20-5. (in Russian)

Сведения об авторах:

Долгова Динара Ришатовна, канд. биол. наук, доцент каф. физиологии и патофизиологии

Абакумова Татьяна Владимировна, канд. биол. наук, доцент каф. физиологии и патофизиологии

Антонеева Инна Ивановна, доктор мед. наук, проф. каф. онкологии и лучевой диагностики

Насырова Елена Юрьевна, аспирант каф. общей и клинической фармакологии с курсом микробиологии

Генинг Снежанна Олеговна, инженер-исследователь Научно-исследовательского медико-биологического центра

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616.155-092.1+613.6

Осиков М.В.¹, Огнева О.И.¹

Взаимосвязь между изменением этологического статуса и концентрацией некоторых цитокинов в крови при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного освещения

Научно-образовательный центр «Проблемы фундаментальной медицины»

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

Изменение естественного ритма смены дня и ночи приводит к развитию десинхроноза, нарушению координированной мышечной деятельности, адекватной поведенческой активности, снижению внимания при выполнении работы в ночное время специалистами разного профиля. Изменения этологического статуса могут потенцировать или ослаблять изменения показателей иммунного статуса, оказывать влияние на формирование аллостатической нагрузки при десинхронозе. **Цель работы** — изучение взаимосвязи между изменениями этологического статуса и концентрацией некоторых цитокинов в периферической крови при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного освещения. **Методика.** Исследование выполнено на 158 половозрелых морских свинок, которых случайным образом распределили на 2 группы: 1-я группа — животные, находящиеся в условиях стандартного фиксированного (12 ч свет / 12 ч темнота) светодиодного освещения (СФСДО); 2-я группа — животные с десинхронозом в условиях светодиодного освещения (ДЕССДО). Световой десинхроноз создавали путём содержания животных при круглосуточном освещении в течение 30 сут. Поведенческую активность исследовали в тесте «открытое поле», когнитивную функцию оценивали с помощью водного «лабиринта» Морриса. Методом иммуноферментного анализа определяли в периферической крови концентрацию интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерферона-гамма (ИФН-γ), мелатонина, кортизола с помощью специфичных для морских свинок тест-систем. **Результаты.** Установлено, что у животных при десинхронозе в условиях светодиодного освещения в динамике 10—30 сут. наблюдений появляются признаки тревоги, угнетения ориентировочно-исследовательского поведения, снижения долговременной памяти и способности к обучению, нарушения пространственной ориентации. Установлено, что при десинхронозе в условиях светодиодного освещения на 10-е, 20-е и 30-е сут. в периферической крови концентрация мелатонина снижается, концентрация кортизола повышается. В периферической крови отмечено снижение концентрации ИЛ-4 на 20-е и 30-е сут., снижение концентрации ИФН-γ на 30-е сут. По результатам корреляционного анализа, изменения этологического статуса и когнитивной функции прогрессируют по мере снижения в крови концентрации ИЛ-4 и ИФН-γ, концентрации мелатонина, повышения концентрации кортизола. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного освещения изменения этологического статуса сопряжены с прогрессированием изменений иммунного статуса.

Ключевые слова: этологический статус; десинхроноз; мелатонин; ИЛ-4; ИФН-γ.

Для цитирования: Осиков М.В., Огнева О.И. Взаимосвязь между изменением этологического статуса и концентрацией некоторых цитокинов в крови при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного освещения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 93—100.

Для корреспонденции: Огнева Ольга Игоревна, очный аспирант каф. патологической физиологии, научно-образовательного центра «Проблемы фундаментальной медицины» ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, e-mail: ognevaolga2@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 06.09.2016

Osikov M.V.¹, Ogneva O.I.¹

Relationship between the change of ethological status and concentration of certain cytokines in blood in experimental desynchronosis under led lighting

Research and Education Center «Problems of Fundamental Medicine» South Ural State Medical University; 64, ul. Vоровского, Chelybinsk, 454092, Russia

Changing the natural rhythm of day and night leads to the development of DS, disruption of coordinated muscular activity, adequate behavioral activity, a decrease of attention in the performance of night work by experts in various fields. Changes ethological status may potentiate or weaken the changes in the indices of immune status, contribute to the formation of allostatic load at desynchronization. **The purpose** — to investigate the relationship between changes ethological status and concentration of certain cytokines in peripheral blood in experimental desynchronization under LED lighting. **Methods.** The study was performed on 158 adult guinea pigs, which were randomly assigned into 2 groups: 1 group- animals in the conditions of standard fixed (12 h light / 12 h dark) LED lighting (SFSSDO); 2 group- animals with jet lag in terms of LED lighting (DESSDO). Light desynchronization created by keeping animals at clock coverage for 30 days. Behavioral activity was studied in the test «open field» cognitive function was assessed using aqueous «labyrinth» Morris. By ELISA was determined on the apparatus in the peripheral blood concentration of interleukin — 4 (IL-4), interferon-gamma (IFN- γ), melatonin, cortisol via specific for guinea pig test systems. **Results.** It was found that in animals of DS in terms of LED lighting in the dynamics of 10—30 days of observation show signs of anxiety, depression orienting-exploratory behavior, reduce the long-term memory and learning ability, spatial orientation disorders. It found that when a jet lag LED lighting conditions for 10 days, 20 days and 30 days in peripheral blood melatonin concentration decreases, the concentration of cortisol rises. In peripheral blood decreased IL-4 concentrations of 20 and 30 days, reducing the concentration of IFN- γ at 30 days. Based on the results of correlation analysis, ethological change status and progress of cognitive function with a decrease in the blood concentration of IL-4 and IFN- γ , the concentration of melatonin increase cortisol levels. **Conclusion.** The results indicate that in experimental conditions in desynchronization LED lighting changes ethological status are associated with the progression of immune status changes.

Keywords: ethological status; desynchronization; melatonin; IL-4; IFN- γ .

For citation: Osikov M.V., Ogneva O.I. Relationship between the change of ethological status and concentration of certain cytokines in blood in experimental desynchronization under led lighting. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60(4): 93—100. (in Russ.).

For correspondence: Olga I. Ogneva — PhD — student of the Department of Pathological Physiology, Research and Education Center «Problems of Fundamental Medicine» South Ural State Medical University; 64, ul. Vorovskogo, Chelybinsk, 454092, Russia

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest. (обязательно указать)

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

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

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

Received: 06.09.2016

Введение

В настоящее время большую часть своей жизни люди проводят в помещениях с низким уровнем естественного света и использованием искусственных люминесцентных, светодиодных и других источников освещения как днем, так и ночью [1, 2]. Изменение естественного ритма смены дня и ночи может иметь серьезные последствия, приводить к развитию десинхроноза, артериальной гипертензии, злокачественных новообразований, нарушению координированной мышечной деятельности, адекватной поведенческой активности, снижению внимания при выполнении работы в ночное время специалистами разного профиля [3—5].

Развитие десинхроноза связывают с изменением синтеза мелатонина (МТ), специфические мембранные рецепторы к которому с разной аффинностью МТ-1 и МТ-2 представлены на клетках гипофиза, супрахиазматического ядра гипоталамуса, сетчатки глаза, а также на иммунокомпетентных клетках, в том

числе на тимоцитах, спленоцитах, моноцитах, натуральных киллерах, ядерные рецепторы к мелатонину обнаружены на Т-лимфоцитах [6—9]. Цитокины участвуют в регуляции иммунных реакций, изменение их синтеза и секреции при десинхронозе приводит к изменению врожденного и адаптивного иммунитета [10, 11]. Изменения этологического статуса при десинхронозе могут потенцировать или ослаблять изменения показателей иммунного статуса, вносить вклад в формирование аллоstaticеской нагрузки, поскольку функция нервной системы рассматривается вместе с функцией иммунной и эндокринной систем в составе нейро-иммунно-эндокринной системы регуляции гомеостаза [12, 13]. Большинство исследований, посвященных нейроиммунным взаимодействиям, проведено при инфекционных, аутоиммунных заболеваниях, травматических повреждениях. Эти взаимодействия реализуются преимущественно за счет влияния повышенной концентрации ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-4, ИЛ-6, ИФН- γ на клетки ЦНС [14—17]. Отмече-

но, что повышенный уровень в плазме ИЛ-4 улучшает обучение и пространственную ориентацию, а ИНФ- γ обладает нейропротекторными свойствами по отношению к нейронам гиппокампа [18].

Цель исследования — изучение взаимосвязи между изменениями этологического статуса и концентрацией некоторых цитокинов в периферической крови при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного освещения.

Методика

Работа выполнена на 158 половозрелых морских свинок массой 300 ± 50 г из питомника лабораторных животных филиала ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ (с. Горный, Чишминского района, Башкортостан). Эксперимент проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETSIN 123, 18 марта 1986 г.), включая приложение А от 15.06.2006 г., с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях от 22.09.2010 г.

Животных случайным образом распределили на 2 группы: 1-я группа ($n = 78$) — животные, находящиеся в условиях стандартного фиксированного (12 ч свет / 12 ч темнота) светодиодного освещения (СФСДО); 2-я группа ($n = 80$) — животные с десинхронозом в условиях светодиодного освещения (ДЕССДО). В работе использованы светодиодные источники освещения «ISAlight — Офис 32» (ООО «Инженерные Системы Автоматизации», Россия) с цветовой температурой 4500 К (белый), световым потоком не менее 2300 Лм, пульсацией светового потока 1%, уровнем освещенности 400 лк. Световой десинхроноз создавали содержанием морских свинок при круглосуточном (24 ч) искусственном освещении [19, 20]. Продолжительность эксперимента составила 30 сут. Оценку показателей осуществляли на 10-е, 20-е, 30-е сут. эксперимента. Поведенческую активность исследовали в тесте «открытое поле», регистрировали горизонтальную активность, вертикальную активность, исследовательскую активность, число актов грумминга, количество фекальных болюсов. Оценку когнитивной функции осуществляли с помощью ряда тестов в водном «лабиринте» Морриса: теста со скрытой платформой, теста на зрительное восприятие, теста без платформы. Поведенческие акты животных регистрировали с помощью цифровой видеокамеры «Logitech HD C525» (Китай). Полученные данные обрабатывали с использованием компьютерных программ «Real Timer» (ООО «НПК Открытая Наука», Россия) и «Any-maze» («Stoelting Co.», США).

Кровь для исследований забирали путем пункции сердца в области левого желудочка после торакотомии, под эфирным наркозом в соответствии с правилами эвтаназии AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. Методом иммуноферментного анализа на аппарате «Иммулайт 2000» (США) определяли в периферической крови концентрацию интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерферона-гамма (ИНФ- γ) с помощью специфичных для морских свинок тест-систем производителя «Uscn. Life Science Inc.» (Китай), концентрацию мелатонина, кортизола — с помощью специфичных для морских свинок тест-систем производителя «Cusabio» (Китай).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ «Statistica v. 10.0 for Windows». Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием критериев Манна—Уитни (U), Вальда—Вольфовитца (WW). Для выявления связи между изучаемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R).

Результаты и обсуждение

При экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного освещения на 10-е сут. не обнаружено изменений показателей в тесте «открытое поле» по сравнению с группой СФСДО (табл. 1). На 20-е сут. снижается горизонтальная, вертикальная и исследовательская активность, увеличивается количество фекальных болюсов. На 30-е сут. эксперимента снижается горизонтальная и исследовательская активность, повышается количество фекальных болюсов по сравнению с группой СФСДО. Таким образом, горизонтальная и исследовательская активность снижаются на 20-е и 30-е сут. наблюдения, вертикальная активность снижается на 20-е сут., количество фекальных болюсов увеличивается на 20-е и 30-е сут., количество актов грумминга значительно не изменяется на всех сроках наблюдения. Полученные результаты позволяют констатировать появление признаков тревоги на 20-е сут., усиливающейся на 30-е сут., угнетения ориентировочно-исследовательского поведения на 10-е сут., прогрессирующего на 20-е и 30-е сут.

При проведении теста со скрытой платформой в водном «лабиринте» Морриса время поиска животными скрытой под водой платформы на 10-е и 20-е сут. эксперимента не отличается от группы СФСДО во все дни проведения методики, на 30-е сут. время нахождения платформы удлиняется во все дни проведения методики по сравнению с группой СФСДО (табл. 2). Отметим, что время поиска скрытой платформы определяется когнитивной функцией (способностью ориентации в пространстве и памятью)

и двигательной активностью животных. При этом одно и то же расстояние может быть преодолено за разное время в зависимости от скорости движения, поэтому более информативным показателем оценки когнитивной функции является длина траектории поиска скрытой платформы как фактор, который зависит только от ориентации в пространстве и памяти животных, а не от их двигательной активности (скорости перемещения в «лабиринте» Морриса).

При исследовании длины траектории поиска скрытой платформы не обнаружено отличий от группы СФСДО на 10-е сут. эксперимента (табл. 3). На 20-е сут. пройденный животными путь поиска платформы увеличивается на третий и четвертый дни проведения методики. На 30-е сут. длина траектории увеличивается во все дни проведения методики по сравнению с группой сравнения. Итак, в тесте со скрытой платформой способность животных к обучению и пространственной ориентации на 10-е сут. не

страдает, на 20-е и 30-е сут. наблюдаются признаки снижения способности к обучению и признаки нарушения пространственной ориентации.

При проведении теста на зрительное восприятие время нахождения видимой платформы достоверно удлинняется только на 30 сутки по сравнению с группой СФСДО, что свидетельствует об ухудшении пространственной ориентации у животных (табл. 4). При оценке теста без платформы наблюдается уменьшение доли времени нахождения животного в той области, где располагалась подводная платформа на 20-е сут. и 30-е сут. (табл. 4). Это указывает на то, что животные хуже запоминали место расположения скрытой платформы по наружным ориентирам и отражает снижение долговременной памяти при десинхронозе.

Эмоциональные состояния сопровождаются различными вегетативными явлениями, которые у животных удобно учитывать по количеству актов дефекации [18]. Животные, которые меньше передвигаются и у которых

Таблица 1

Показатели теста «открытое поле» при десинхронозе в условиях светодиодного искусственного освещения (M ± m)

Показатели	10-е сут.		20-е сут.		30-е сут.	
	Группа 1, СФСДО (n = 6)	Группа 2, ДЕССДО (n = 6)	Группа 1, СФСДО (n = 6)	Группа 2, ДЕССДО (n = 8)	Группа 1, СФСДО (n = 6)	Группа 2, ДЕССДО (n = 6)
Горизонтальная активность, количество актов	29 ± 2,2	33 ± 4,6	34 ± 5,0	25 ± 1,9*	31 ± 2,5	22 ± 2,0*
Вертикальная активность, количество актов	3 ± 0,4	2 ± 0,2	4 ± 0,8	2 ± 0,3*	3 ± 0,2	2 ± 0,4
Исследовательская активность, количество актов	5 ± 0,8	4 ± 0,4	6 ± 0,9	2 ± 0,3*	4 ± 0,6	2 ± 0,3*
Грумминг, количество актов	3 ± 0,4	3 ± 0,7	4 ± 0,8	3 ± 1,3	1 ± 0,2	1 ± 0,6
Фекальные болюсы, количество актов	6 ± 0,9	7 ± 0,2	6 ± 0,6	7 ± 0,6*	5 ± 0,7	11 ± 0,6*

Примечание. * — статистически значимые (p<0,05) различия с группой стандартного фиксированного светодиодного освещения (СФСДО).

Таблица 2

Время нахождения морскими свинками скрытой под водой платформы при десинхронозе в условиях светодиодного освещения (M ± m)

Показатели	10-е сут.		20-е сут.		30-е сут.	
	Группа 1, СФСДО (n = 6)	Группа 2, ДЕССДО (n = 6)	Группа 1, СФСДО (n = 6)	Группа 2, ДЕССДО (n = 6)	Группа 1, СФСДО (n = 8)	Группа 2, ДЕССДО (n = 8)
1-й день, с	73 ± 4,2	73 ± 9,1	83 ± 1,7	70 ± 9,3	59 ± 4,2	72 ± 3,8*
2-й день, с	63 ± 3,2	69 ± 9,6	61 ± 10,0	54 ± 8,2	22 ± 9,4	46 ± 9,5*
3-й день, с	48 ± 3,8	53 ± 10,4	48 ± 5,0	48 ± 5,4	17 ± 2,4	41 ± 5,9*
4-й день, с	43 ± 5,8	40 ± 5,4	47 ± 6,3	47 ± 7,9	14 ± 3,0	26 ± 4,4*

Примечание. Здесь и далее * — статистически значимые (p<0,05) различия с группой стандартного фиксированного светодиодного освещения (СФСДО)

наблюдается частая дефекация в ситуации открытого поля, считаются более эмоциональными, чем те, которые много передвигаются, но имеют низкий уровень дефекации [21, 22]. Таким образом, сочетание снижения горизонтальной активности и повышения количества фекальных болюсов на 20-е и 30-е сут. указывает на наличие у животных тревоги [23, 24]. В данные сроки снижение горизонтальной активности сочетается со снижением показателей исследовательской и вертикальной активности, что свидетельствует об угнетении ориентировочно-исследовательского поведения. Изменения времени и длины траектории в тесте со скрытой платформой демонстрируют, что способность животных к обучению на 10 сутки не страдает. Учитывая, что на 20-е сут. увеличивается только длина траектории нахождения скрытой под водой платформы животным, а показатели времени не отличаются от группы сравнения, можно сделать заключение о том, что в данный срок у животных снижается способность к обучению и нарушается пространственная ориентация, что может ком-

пенсировать скорость плавания в бассейне. На 30-е сут. увеличивается как время, так и пройденный путь нахождения скрытой под водой платформы по сравнению с 10-е и 20-е сут., что указывает на прогрессирующее снижение способности к обучению и нарушение пространственной ориентации.

Полагаем, что обнаруженные изменения этологического статуса при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного освещения, в определенной мере, связаны с изменением концентрации в крови мелатонина и кортизола. Известно, что в условиях светового десинхроноза снижается секреция мелатонина эпифизом, а сам десинхроноз рассматривается как стресс-реакция, сопровождающаяся повышением концентрации кортизола в крови [25—27]. Установлено, что при десинхронозе в условиях светодиодного освещения концентрация мелатонина в периферической крови снижается на 10-е, 20-е и 30-е сут. (табл. 5). Концентрация кортизола в периферической крови повышается на 10-е, 20-е и 30-е сут.

Таблица 3

Длина траектории поиска скрытой платформы при десинхронозе в условиях светодиодного освещения (M ± m)

Показатели	10-е сут.		20-е сут.		30-е сут.	
	Группа 1, СФСДО (n = 6)	Группа 2, ДЕССДО (n = 6)	Группа 1, СФСДО (n = 6)	Группа 2, ДЕССДО (n = 6)	Группа 1, СФСДО (n = 8)	Группа 2, ДЕССДО (n = 8)
1-й день, м	22 ± 1,7	20 ± 0,7	20 ± 2,1	22 ± 0,4	22 ± 1,7	27 ± 0,6*
2-й день, м	18 ± 0,9	18 ± 0,5	19 ± 1,4	21 ± 0,7	19 ± 1,0	24 ± 0,9*
3-й день, м	14 ± 1,2	17 ± 1,2	15 ± 1,1	19 ± 0,7*	13 ± 10,1	23 ± 1,7*
4-й день, м	13 ± 1,9	13 ± 0,9	12 ± 1,0	15 ± 0,7*	12 ± 0,4	20 ± 0,7*

Таблица 4

Показатели теста на зрительное восприятие и теста без платформы в водном «лабиринте» Морриса при десинхронозе в условиях светодиодного освещения (M ± m)

Показатели	10-е сут.		20-е сут.		30-е сут.	
	Группа 1, СФСДО (n = 6)	Группа 2, ДЕССДО (n = 6)	Группа 1, СФСДО (n = 6)	Группа 2, ДЕССДО (n = 6)	Группа 1, СФСДО (n = 8)	Группа 2, ДЕССДО (n = 8)
Время, с	49 ± 5,8	57 ± 5,7	44 ± 8,1	59 ± 4,1	55 ± 4,4	73 ± 7,5*
Доля времени, %	68 ± 5,8	52 ± 8,49	69 ± 3,9	51 ± 4,1*	67 ± 8,9	49 ± 3,5*

Таблица 5

Концентрация мелатонина, кортизола и цитокинов в крови при десинхронозе в условиях светодиодного освещения (M ± m)

Показатели	10-е сут.		20-е сут.		30-е сут.	
	Группа 1, СФСДО (n = 6)	Группа 2, ДЕССДО (n = 6)	Группа 1, СФСДО (n = 6)	Группа 2, ДЕССДО (n = 6)	Группа 1, СФСДО (n = 8)	Группа 2, ДЕССДО (n = 8)
Мелатонин, нг/мл	5 ± 0,1	4 ± 0,1*	4 ± 0,2	4 ± 0,2*	5 ± 0,1	3 ± 0,1*
Кортизол, нг/мл	179 ± 2,4	186 ± 1,9*	182 ± 2,6	188 ± 2,6*	183 ± 1,1	189 ± 2,4*
ИФН-γ, пг/мл	11 ± 2,3	9 ± 1,8	8 ± 3,8	7 ± 0,8	6 ± 1,7	3 ± 0,4*
ИЛ-4, пг/мл	23 ± 5,9	21 ± 4,6	22 ± 3,5	16 ± 2,0*	17 ± 3,7	12 ± 1,6*

Проведен корреляционный анализ между концентрацией мелатонина в периферической крови и показателями теста «открытое поле» (табл. 6). Как видно, снижение горизонтальной активности, исследовательской активности, вертикальной активности, повышение количества фекальных болюсов нарастают по мере снижения концентрации мелатонина в периферической крови. При проведении корреляционного анализа обнаружено присутствие разных по силе и направлению связей между концентрацией мелатонина в периферической крови и показателями тестов в водном «лабиринте» Морриса, а также показателями концентрации кортизола и показателями теста «открытое поле» и тестами водного «лабиринта» Морриса (табл. 6). Как видно, увеличение длины траектории поиска скрытой платформы, снижение времени нахождения видимой платформы и доля времени нахождения животного в области расположения скрытой платформы нарастают по мере снижения концентрации мелатонина в периферической крови.

Таким образом, снижение исследовательской активности, вертикальной активности, повышение количества фекальных болюсов, увеличение длины траектории поиска скрытой платформы, снижение времени нахождения видимой платформы и доля времени нахождения животного в области расположения скрытой платформы нарастают по мере повышения концентрации мелатонина в периферической крови.

Результаты оценки концентрации ИЛ-4, ИФН-γ в периферической крови при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного освещения представлены в табл. 7. Выбор исследуемых цитокинов обусловлен тем, что ИЛ-4 участвует в пролифе-

рации и дифференцировке Th0 в Th2, являющихся эффекторами гуморального иммунного ответа; ИФН-γ участвует в пролиферации и дифференцировке Th0 в Th1, являющихся эффекторами клеточного иммунного ответа.

Установлено снижение концентрации ИЛ-4 на 20-е и 30-е сут. по сравнению с группой СФСДО. Концентрация ИФН-γ снижается на 30 сутки эксперимента. Ранее нами показано, что снижение концентрации в крови указанных цитокинов приводит к дисрегуляции иммунного ответа при десинхронозе в условиях светодиодного освещения, что сопровождается развитием лимфоцитопении, угнетением Th1-и Th2-зависимого иммунного ответа [10, 29].

При проведении корреляционного анализа между показателями этологического статуса и концентрацией цитокинов в периферической крови отмечено, что снижение горизонтальной активности, исследовательской активности, вертикальной активности, повышение количества фекальных болюсов, увеличение длины траектории поиска скрытой платформы, снижение времени нахождения видимой платформы и доля времени нахождения животного в области расположения скрытой платформы ассоциированы со снижением концентрации ИЛ-4 в периферической крови (табл. 7). Снижение горизонтальной активности, исследовательской активности, вертикальной активности, увеличение длины траектории поиска скрытой платформы и доля времени нахождения животного в области расположения скрытой платформы нарастают по мере снижения концентрации ИФН-γ в периферической крови.

Таким образом, при десинхронозе в условиях светодиодного освещения по мере снижения в перифериче-

Корреляция между концентрацией мелатонина, кортизола и показателями этологического статуса при экспериментальном десинхронозе (M ± m)

Таблица 6

Показатели	Мелатонин, нг/мл			Кортизол, нг/мл		
	10-е сут.	20-е сут.	30-е сут.	10-е сут.	20-е сут.	30-е сут.
Горизонтальная активность, количество актов	R = -0,24	R = 0,53	R = 0,99	R = 0,39	R = -0,29	R = -0,03
Исследовательская активность, количество актов	R = 0,71	R = 0,49	R = 0,90	R = -0,62	R = -0,52	R = 0,09
Вертикальная активность, количество актов	R = 0,71	R = 0,06	R = -0,09	R = -0,62	R = -0,80	R = 0,06
Фекальные болюсы, количество актов	R = -0,52	R = -0,63	R = -0,74	R = 0,61	R = 0,12	R = 0,18
Длина траектории, 3 день, м	R = -0,36	R = -0,64	R = -0,52	R = 0,67	R = 0,99	R = 0,24
Длина траектории, 4 день, м	R = -0,47	R = -0,69	R = -0,50	R = 0,69	R = 0,78	R = 0,72
Время нахождения видимой платформы, с	R = -0,47	R = -0,42	R = -0,84	R = 0,58	R = 0,36	R = 0,15
Доля времени, %	R = 0,74	R = 0,64	R = 0,41	R = -0,67	R = -0,23	R = -0,25

Примечание. Здесь и далее — R — коэффициент корреляции Спирмена, полужирным выделена достоверная связь (p<0,05)

Таблица 7

Корреляции между концентрацией цитокинов в периферической крови и показателями этологического статуса при экспериментальном десинхронозе ($M \pm m$)

Показатели	ИЛ-4, пг/мл			ИФН- γ , пг/мл		
	10 сут.	20 сут.	30 сут.	10 сут.	20 сут.	30 сут.
Горизонтальная активность, количество актов	R = 0,69	R = 0,47	R = 0,85	R = 0,59	R = 0,64	R = 0,05
Исследовательская активность, количество актов	R = 0,06	R = 0,56	R = 0,90	R = 0,77	R = 0,71	R = 0,06
Вертикальная активность, количество актов	R = 0,06	R = 0,25	R = 0,90	R = 0,77	R = 0,12	R = 0,04
Фекальные болюсы, количество актов	R = -0,39	R = -0,13	R = -0,89	R = -0,17	R = -0,22	R = -0,27
Длина траектории, 3 день, м	R = -0,17	R = -0,55	R = -0,83	R = -0,05	R = -0,53	R = -0,35
Длина траектории, 4 день, м	R = -0,32	R = -0,55	R = -0,47	R = -0,57	R = -0,62	R = -0,41
Время нахождения видимой платформы, с	R = -0,92	R = -0,33	R = -0,53	R = -0,24	R = -0,36	R = -0,22
Доля времени, %	R = 0,25	R = 0,16	R = 0,76	R = 0,63	R = 0,15	R = 0,37

ской крови концентрации ИЛ-4, концентрации ИФН- γ , концентрации мелатонина, повышения концентрации кортизола нарастают признаки тревоги, угнетение ориентировочно-исследовательского поведения, снижение долговременной памяти, способности к обучению и нарушение пространственной ориентации.

Выявленные взаимосвязи можно объяснить прямым влиянием цитокинов на регуляцию процессов нейрогенеза и молекулярно-клеточные механизмы, ответственные за процессы обучения, памяти и познания, за счет взаимодействия со специфичными рецепторами на клетках нервной системы (астроцитах, микроглии, нейронах гиппокампа) [30, 31]. Воздействие цитокинов на нервные клетки обеспечивается, во-первых, активным транспортом цитокинов через гематоэнцефалический барьер, во-вторых, передачей цитокиновых сигналов через афферентные нервные волокна, в частности блуждающего нерва, в-третьих, эффектами цитокинов *in situ* [32, 33]. Цитокины способны повышать собственное проникновение в ЦНС через увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера [34].

References

1. Erren T.C., Reiter R.J. Light Hygiene: Time to make preventive use of insights old and new into the nexus of the drug light, melatonin, clocks, chronodisruption and public health. *Med. Hypotheses*. 2009; 73 (4): 537-41.
2. Martinez-Nicolas A., Ortiz-Tudela E. Madrid J.A., Rol M.A. Crosstalk between environmental light and internal time in humans. *Chronobiol. Int*. 2011; 28 (7): 617-29.
3. Vinogradova I.A., Ilyuha V.A., Fedorova A.S., Hizhkin E.A., Unzhakov A.R., Yunash V.D. Age-related changes in physical performance and some biochemical parameters of rat muscles under the influence of light conditions and medi-

cations epiphysis. *Uspekhi-gerontologii*. 2007; 20(1): 66-73. (in Russian)

4. Anisimov V.N., Vinogradova I.A., Bukalev A.V., Popovich I.G., Zabezhinskij M.A., Panchenko A.V., Yndyk M.L., Yurova M.N. Light desynchronization risk of malignant tumors in laboratory animals: state the problem. *Voprosy onkologii*. 2014; 60(2): 15-27. (in Russian)

5. Bondarenko L.A., Mishchenko T.V. Effect of natural light recovery mode for blood pressure indicators in rabbits gipopinealizmom induced periods of light hour. *Fotobiologiya i eksperimentalnaya fotomeditsina*. 2014; 1,2: 54-8. (in Russian)

6. Cernysiov V., Bozaite R., Mauricas M., Girkontaite I. Influence of circadian time and lighting conditions on expression of melatonin receptors 1 and 2 in murine lymphocytes. *In Vivo*. 2014; 28 (5): 831-5.

7. Cernysiov V., Bozaite R., Mauricas M., Girkontaite I. The expression of MTNR3 and nuclear receptors in murine leucocytes. *In Vivo*. 2014; 24 (5): 827-30.

8. Pandi-Perumal S. R., Srinivasan V., Maestroni G. J., Cardinali D.P., Poeggeler B., Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS Journal*. 2006. 273: 2813-38.

9. Zlotos D.P., Jockers R., Cecon E., Rivara S., Witt-Enderby P.A. MT1 and MT2 melatonin receptors: ligands, models, oligomers and therapeutic potential. *J. Med. Chem*. 2014; 57 (8): 3161-85.

10. Ogneva, O.I., Osikov M.V., Gizinger O.A., Fedosov A.A. The mechanism of immune status changes in the experimental conditions of desynchronization in LED lighting. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2015; 3; Available at: URL: <http://www.science-education.ru/123-19791> (Accessed: 22 January 2016). (in Russian)

11. Shurlygina A.V., Kovshik I.G., Hoshhenko O.M., Mel'nikova E.V., Panteleeva N.G., Trufakin V.A. The impact breached light conditions on the content of interferon gamma in blood plasma and the proliferative activity of the lymphoid organs of mice cells. *Tsitokiny i vospalenie*. 2010; 9 (1): 21-4. (in Russian)

12. Juster R.P., Sindi S., Marin M.F., Perna A., Hasheimi A., Pruessner J.C. et al. A clinical allostatic load index is associated with burnout symptoms and hypocortisolemic

profiles in healthy workers. *Psychoneuroendocrinology*. 2011; 36 (6): 797-805.

13. McEwen B.S., Karatsoreos I.N. Sleep Deprivation and Circadian Disruption: Stress, Allostasis and Allostatic Load. *Sleep Med. Clin.* 2015; 10 (1): 1-10.

14. Dantzer R., O'Connor J.C., Freund G.G., Johnson R.W., Kelley K.W. From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 2008; 9 (1): 46-56.

15. Steinman, L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nat Immunol.* 2004; 5 (6): 575-581.

16. Huang Y., Henry C.J., Dantzer R., Johnson R.W., Godbout J.P. Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide. *Neurobiol. Aging*. 2008; 29 (11): 1744-53.

17. Yirmiya R., Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav. Immun.* 2011; 25 (2): 181-213.

18. O'Donnell L.A., Henkins K.M., Kulkarni A., Matullo C.M., Balachandran S., Pattisapu A.K. et al. Interferon gamma induces protective non-canonical signaling pathways in primary neurons. *Neurochem.* 2015; 135 (2): 309-22.

19. Pertsov S.S. Desynchronization and erosive and ulcerative lesions of the stomach in rats active or passive in the open-field test: effect of exogenous melatonin. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2003; (3): 283-6. (in Russian)

20. Trufakin V.A., Shurlygina A.V., Michurina S.V. Lymphatic system — circadian time organization and desynchronization. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal*. 2012; (1): 5-12. (in Russian)

21. Hall C.S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *J. comp. physiol. Psychol.* 1936; 22: 345-52.

22. Koplík E.V., Salieva P.M., Gorbunova A.V. The test of «open field» as a prognostic criterion of stability Wistar rats to emotional stress. *Zhurn. vyssh. nervn. deyat.* 1995; 45 (4): 775-81. (in Russian)

23. Jumatov E.A., Meshherjakova O.A. Prediction of resistance to emotional stress on the basis of individual testing

behavior. *Zhurn. vyssh. nervn. deyat.* 1990; 40 (3): 575-80. (in Russian)

24. Majorov O.Ju. Evaluation of individual-typological features of behavior and the stability of the intact male albino rats on the basis of normal factor model ethological range of indicators in the «open field» test. *Klinicheskaya informatika i telemeditsina*. 2011; 7 (8): 21-32. (in Russian)

25. Russe P.A. Relationships between exploratory behaviour and fear: a review. *Brit. J. Psychol.* 1973; 64: 417-33.

26. Cho Y., Ryu S.H., Lee B.R., Kim K.H., Lee E., Choi J. Effects of artificial light at night on human health: A literature review of observational and experimental studies applied to exposure assessment. *Chronobiol. Int.* 2015; 32 (9): 1294-310.

27. Hetagurova L.G. eds. *Stress (chronomedical aspects): monograph*. Vladikavkaz : Proekt-Press; 2010. (in Russian)

28. Hasnulín V.I., Hasnulína A.V., Krasil'nikova V.A. Psycho-physiological processes and desynchronization young people from different regions of Siberia during the transition to daylight saving time in 2010. *Mir nauki, kul'tury, obrazovaniya*. 2010; (6-1): 279-83. (in Russian)

29. Osikov M.V., Gizinger O.A., Ogneva O.I. Effect of melatonin on blood cytokine profile in experimental desynchronization. *Meditsinskaya immunologiya*. 2015; 17 (special issue): 301-302. (in Russian)

30. Yirmiya R., Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav. Immun.* 2011; 25 (2): 181-213.

31. McAfoose J., Baune B.T. Evidence for a cytokine model of cognitive function. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2009; 33 (3): 355-66.

32. Banks W.A., Farr S.A., Morley J.E. Entry of blood-borne cytokines into the central nervous system: effects on cognitive processes. *Neuroimmunomodulation*. 2003; 10 (6): 319-27.

33. Gutierrez E.G., Banks W.A., Kastin A. Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *Journal of neuroimmunology*. 1993; 47: 169-76.

34. Banks W.A., Erickson M.A. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiol. Dis.* 2010; 37 (1): 26-32.

Сведения об авторах:

Осиков Михаил Владимирович, доктор мед. наук, проф., каф. патологической физиологии, вед. науч. сотр. научно-образовательного центра «Проблемы фундаментальной медицины» ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616.155.3+616.24-002.5

Сабадаш Е.В., Скорняков С.Н., Павлов В.А., Новиков Б.И., Ершова А.В., Егоров Е.А.

Активные формы кислорода и высокоактивные соединения азота лейкоцитов крови в механизмах защиты и повреждения при туберкулезе легких

ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России, 620039, г. Екатеринбург, ул. 22 Партсъезда, д. 50

Цель — определение роли активных форм кислорода (АФК) и высокоактивных соединений азота (ВСА) в механизмах защиты и повреждения у больных основными клиническими формами туберкулеза легких. **Методика.** Обследовано 4 группы пациентов (92 чел.): 1-я гр. — впервые выявленный инфильтративный туберкулез с локализацией процесса в пределах одной доли легкого (25 пациентов); 2-я гр. — впервые выявленный туберкулез легких с отграниченным процессом (туберкуломы) (42 пациента); 3-я — 15 пациентов с фиброзно-кавернозным туберкулезом легких с давностью заболевания не более 2 лет; 4-я гр. — контроль (10 здоровых лиц). **Результаты.** Установлено, что хроническая туберкулезная инфекция подавляет фагоцитарную активность лейкоцитов при любой исследуемой форме ее развития. Однако при более тяжелых формах туберкулеза с преобладанием экссудативных тканевых реакций (инфильтративный туберкулез) уровень этих метаболитов в лейкоцитах нарастает, определяя их повреждающее действие. При отграниченных формах туберкулеза легких — туберкуломах уровень этих метаболитов (особенно ВСА) в лейкоцитах снижается, что может иметь защитное значение. **Заключение.** Полученные результаты позволяют сделать заключение, что в диагностике и оценке характера туберкулезного процесса с успехом может быть использовано определение функционально-метаболических особенностей лейкоцитов крови (фагоцитоз) и плазмы (суммарные перекиси липидов, БУРСТ-ТЕСТ, АФК, ВСА и их производные), а также количество аминокислот (таурин и аргинин) в плазме крови и лейкоцитах.

Ключевые слова: туберкулез легких; лейкоциты; активные формы кислорода; высокоактивные соединения азота.

Для цитирования: Сабадаш Е.В., Скорняков С.Н., Павлов В.А., Новиков Б.И., Ершова А.В., Егоров Е.А. Активные формы кислорода и высокоактивные соединения азота лейкоцитов крови в механизмах защиты и повреждения при туберкулезе легких. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016, 60 (4): 101—106.

Для корреспонденции: Новиков Борис Иванович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., рук. Центра внелегочного туберкулеза ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России, e-mail: binovikov@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 24.03.2016

Sabadash E.V., Skorniakov S.N., Pavlov V.A., Novikov B.I., Ershova A.V., Egorov E.A.

Reactive oxygen species and high-nitrogen compound in the mechanism of protection and damage in white blood cells in pulmonary tuberculosis

FSBI «Ural Research Institute Phthiopolmonology» Ministry of Health, 620039 Yekaterinburg, 22 Party Congress str., 50, Russia

The purpose. The aim of the study was to determine changes in the level of reactive oxygen species (ROS) and high-nitrogen compounds (HNC) of white blood cells of patients with various forms of pulmonary tuberculosis, and attempt to identify the pathogenic importance marked disturbances in protection mechanisms and damaged by the disease. **Methods.** A prospective study of 92 people, who were divided into 4 groups: I — 25 patients with newly diagnosed infiltrative tuberculosis and localization process within the same lobe of the lung, II — 42 patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis with a limited process (tuberculoma), III — 15 patients with fibrosis — cavernosis pulmonary tuberculosis with disease duration of less than 2 years old and group IV — healthy people — 10. **Results.** It has been found that chronic TB infection suppresses the phagocytes activity of leukocytes in any form of study of its development. However, in more severe forms of tuberculosis with a predominance of exudative tissue reactions (infiltrative) levels of these metabolites in the white blood cells increases and they become damaging significance. With limited forms of pulmonary tuberculosis — tuberculoma — levels of these metabolites (especially ICA) in white blood cells is reduced, which may have a protective value. **Conclusion.** The obtained results allow to claim that in the diagnosis and assessment of the nature of the tuberculosis process may be used

definition of functional and metabolic characteristics of blood leukocytes and plasma (phagocytosis, peroxide, total lipid, BURST TEST, AFC, ICA and their derivatives), as well as the number of amino acids, taurine and arginine in plasma and leukocytes.

Keywords: pulmonary tuberculosis; white blood cells; reactive oxygen species; highly nitrogen compounds.

For citation: Sabadash E.V., Skorniakov S.N., Pavlov V.A., Novikov B.I., Ershova A.V., Egorov E.A. Reactive oxygen species and high-nitrogen compound in the mechanism of protection and damage in white blood cells in pulmonary tuberculosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (4): 101–106. (in Russ.)

For correspondence: Boris I. Novikov, PhD, MD, senior researcher, head of the Center of extrapulmonary tuberculosis FGBI «Ural Research Institute Phthisiopulmonology» Ministry of Health, 620039 Yekaterinburg, 22 Party Congress str., 50, Russia, e-mail: binovikov@mail.ru

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

Funding. The study did not have sponsorship.

Received 24.03.2016

Введение

Развитие и течение туберкулеза зависят от реактивности организма, состояния его защитных сил, а также биологических особенностей возбудителя. Эти факторы в значительной степени обуславливают характер тканевых реакций.

Результаты исследований по выяснению роли активных форм кислорода (АФК) при различных заболеваниях легких [1, 2] позволяют утверждать, что легкие весьма чувствительны к повреждающему действию АФК, несмотря на мощную антиоксидантную систему. Прежде всего, при избытке АФК страдают мембраны как за счет прямого взаимодействия с ними АФК, так и за счет образования пероксидов и продуктов их катаболизма. Повреждение клеточных мембран приводит к глубоким изменениям ионного состава клеток и субклеточных органелл.

По мере прогрессирования туберкулезного процесса отмечается усиление образования АФК при снижении антиоксидантных ресурсов организма. При этом сначала отмечается рост уровня высокоактивных соединений азота (ВСА) в фагоцитах и плазме крови, а затем по мере прогрессирования процесса и его отягощения отмечается снижение их концентрации [2–6]. Значение этого феномена в патогенетических механизмах туберкулезного воспаления до конца не известно.

В последние годы появляется все больше фактов, свидетельствующих о том, что лейкоциты крови играют важную роль в механизмах неспецифической резистентности к туберкулезу, что связано с генерацией большого количества АФК и ВСА. Лейкоциты принимают активное участие в формировании и поддержании высокой напряженности механизмов приобретенного иммунитета к туберкулезу [7–11]. Однако роль лейкоцитов в этих механизмах исследована недостаточно.

Цель исследования — определение роли АФК и ВСА в патогенезе защиты и повреждения у больных основными клиническими формами туберкулеза легких, отражающих патофизиологические модели специфической воспалительной реакции.

Методика

Было сформировано 4 группы пациентов: 1-я — впервые выявленный инфильтративный туберкулез легких в пределах одной доли (25 пациентов); 2-я — пациенты с туберкуломами легких (42 пациента); 3-я — с фиброзно-кавернозным туберкулезом легких (ФКТ) и давностью заболевания не более двух лет (15 пациентов). Контрольная группа была составлена из 10 здоровых лиц (4-я группа). Критерии включения пациентов в исследование: туберкулезный процесс, продолжительность заболевания не более 2 лет, возраст старше 18 лет, отсутствие у пациентов явных острых сопутствующих заболеваний на момент обследования.

Обследование пациентов осуществлялось в соответствии с методическими рекомендациями по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания, утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ от 29 декабря 2014 г. № 951. Определение фагоцитарной активности лейкоцитов (фаготест) проводилось по общепринятой методике. Определяли в плазме крови и лейкоцитах конечные продукты катаболизма оксида азота-нитрата, суммарных перекисей липидов (ОХУСТАТ), генерации активных форм кислорода лейкоцитами крови (БУРСТ-ТЕСТ), количество свободных аминокислот в плазме крови и лейкоцитах. Содержание свободных аминокислот определяли на газожидкостном аминокислотном анализаторе ААА 339М «МИКРОТЕХНИКА»; количество аминокислот приведено в процентах к общему количеству. Мате-

матическая обработка: полученные данные обрабатывали в программе Excel с использованием непараметрических методов. Оценку значимости различий между выборками проводили, применяя критерий «U» Манна—Уитни. При величине $p < 0,01$ и $p < 0,05$ нулевая гипотеза (отсутствие отличий между выборками) отвергалась и различия между группами считались статистически значимыми.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что при всех исследуемых формах туберкулеза выявлено статистически достоверное снижение числа активно фагоцитирующих нейтрофилов и моноцитов (на 20—25%), что отмечалось ранее нами и другими авторами [7, 9, 10].

Из данных табл. 1 и 2 видно, что угнетение фагоцитоза при инфильтративном туберкулезе сопряжено

с усилением генерации в лейкоцитах активных форм кислорода (по БУРСТ-ТЕСТУ) и суммарных перекисей липидов в лейкоцитах крови и плазме (на 25—50%, статистически значимо в обоих случаях). При этом количество лейкоцитов в крови увеличивается примерно на 50%.

При отграниченных формах туберкулеза — туберкуломах — на метаболическом уровне наблюдается совершенно другая направленность изменений. Так, уровень суммарных перекисей липидов в плазме и лейкоцитах практически не отличается от контроля. В то же время показатели БУРСТ-ТЕСТА в лейкоцитах значимо снижены, примерно на 30%. При ФКТ уровень суммарных перекисей растет до максимальных значений в плазме, равно как и число лейкоцитов в крови (во всех случаях различие с контролем статистически значимо). При этом усиление генерации АФК в лейкоцитах по БУРСТ-ТЕСТУ статистически незначимо.

Таблица 1

Суммарные перекиси липидов (ОХУСТАТ) в плазме и лейкоцитах крови у здоровых и при инфильтративном, фиброзно-кавернозном туберкулезе и туберкуломах легких

Группы	Здоровые		Туберкулез	
	Контроль, N = 10	Инфильтрат, N = 25	ФКТ, N = 10	Туберкулома, N = 42
ОХУСТАТ (мкмоль/л) Плазма	760 (350—924)	1195* (968—1447)	1695* (1178—2340)	793 (589—1156)
ОХУСТАТ (мкмоль/л) Лейкоциты крови	239 (167—344)	1441* (965—1864)	1018 * (874—1436)	231 (89— 354)

Примечание. * — $p < 0,05$: контроль — инфильтративный туберкулез (плазма), контроль — инфильтративный туберкулез (лейкоциты); контроль — ФКТ (плазма), контроль — ФКТ (лейкоциты)

Таблица 2

Показатели генерации АФК в лейкоцитах (БУРСТ-ТЕСТ) у здоровых и при инфильтративном, фиброзно—кавернозном туберкулезе и туберкуломах легких

Группы	Здоровые		Туберкулез	
	Контроль, N = 10	Инфильтрат, N = 25	ФКТ, N = 10	Туберкулома, N = 42
Показатели БУРСТ—ТЕСТА Лейкоциты (клетки в 10^9 на литр)	0,78 (0,45—1,09)	0,96* (0,58—1,86)	0,88 (0,64—1,28)	0,61* (0,26—1,10)

Примечание. * — $p < 0,05$: инфильтративный туберкулез— туберкулома

Таблица 3

Количество стабильных производных оксида азота (нитрат) в лейкоцитах крови у здоровых и при инфильтративном, фиброзно-кавернозном туберкулезе и туберкуломах легких

Группы	Здоровые		Туберкулез	
	Контроль, N = 10	Инфильтрат, N = 25	ФКТ, N = 10	Туберкулома, N = 42
Нитрат (мкмоль/л) Плазма	613 (457—866)	247 * (129—315)	680 (437—920)	668 (450—910)
Нитрат (мкмоль/л) Лейкоциты	278 (138—321)	448* (365—586)	175* (78—244)	123* (64—184)

Примечание. * — различие между группами статистически значимо ($p < 0,05$): 1) контроль — инфильтративный туберкулез (плазма), контроль — 2) инфильтративный туберкулез (лейкоциты); инфильтративный туберкулез — 3) ФКТ (лейкоциты), инфильтративный туберкулез — 4) туберкулома (лейкоциты)

Другим фактором, которому придается важное значение в противостоянии организма и возбудителя туберкулеза, является оксид азота [7, 8, 12, 13]. Нами установлено, что количество его стабильных производных (нитраты) при инфильтративном туберкулезе увеличивается в нейтрофилах почти в 2 раза. Это происходит на фоне повышения уровня суммарных перекисей липидов в плазме крови. Обращает на себя внимание изменение количества стабильных производных оксида азота — нитратов. Так в плазме крови при инфильтративном туберкулезе его количество снижено более чем в 2 раза, а в лейкоцитах, напротив, почти в 2 раза повышено (в обоих случаях статистически значимо) по сравнению с контролем. При туберкуломах количество нитрата в плазме не отличается от контроля, а в лейкоцитах значимо снижается (более чем в 2 раза). При ФКТ количество нитрата в лейкоцитах по сравнению с контролем снижено почти в 2 раза, и почти в 3 раза по сравнению с инфильтративным туберкулезом (статистически значимо в обоих случаях).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что генерация повышенных количеств АФК и ВСА лейкоцитами крови типична для инфильтративных форм туберкулеза, как примера экссудативных тканевых реакций. Преобладание продуктивного компонента воспаления с отчетливыми отграничительными

тканевыми реакциями сопряжено с резким снижением, прежде всего уровня ВСА в лейкоцитах. И даже при ФКТ, где преобладают фиброзно-пластические процессы, прослеживается такая же тенденция.

АФК и ВСА являются мощными инструментами противодействия МБТ на уровне фагоцитов, но при ослаблении защитных механизмов, стабилизирующих мембрану фагоцитирующих клеток (снижение уровня глутатиона, таурина) эти метаболиты начинают повреждать структуры фагоцитирующей клетки и способствовать нарастанию катаболических процессов в организме [8, 12—16].

Реализация защитных механизмов по отношению к МБТ в фагоцитах с участием ВСА и АФК возможна только при наличии мощной антиоксидантной и мембраностабилизирующей защите. Для этого необходимы такие метаболиты, как таурин, метионин, глутатион, глутамат, полиамины [17—20]. В наших предшествующих исследованиях [21] было установлено, что при экспериментальном туберкулезе и у больных инфильтративным туберкулезом в плазме крови и лейкоцитах существенно изменяется количество серосодержащих аминокислот и аминокислот, обогащенных азотом, глутатиона и полиаминов. Поэтому логично было предположить, что при различных формах туберкулеза изменения уровня АФК и ВСА во многом модулируется изменениями в метаболизме и

Содержание свободных аминокислот плазмы у здоровых и при инфильтративном, фиброзно-кавернозном туберкулезе и туберкуломах легких

Таблица 4

Группы	Здоровые	Туберкулез		
		Инфильтрат, N = 25	ФКТ, N = 10	Туберкулома, N = 42
Аминокислоты (% к общему количеству)	Контроль, N = 10	Инфильтрат, N = 25	ФКТ, N = 10	Туберкулома, N = 42
Таурин	1,08 (0,62—1,41)	0,54* ("следы"—0,88)	1,50* (1,06—2,16)	1,23 (0,55—1,41)
Цистеин	3,96 (2,43—4,26)	2,80 (1,86—3,45)	2,86* (1,88—3,08)	2,31* (0,84—2,86)
Метионин	1,15 (0,74—2,04)	0,86 (0,53—1,34)	0,65* ("следы"—0,85)	0,91 (0,48—1,27)
Аргинин	3,05 (2,67—4,25)	1,56* (0,81—2,06)	1,44 (0,76—1,92)	1,42* (0,82—2,10)

Примечание. * — различие между группами статистически значимо (p<0,05): 1) инфильтративный туберкулез — ФКТ (таурин); 2) ФКТ — туберкулома (цистеин); 3) контроль — ФКТ (метионин); 4) контроль — инфильтративный туберкулез (аргинин); 5) контроль — туберкулома (аргинин)

Содержание свободных аминокислот в лейкоцитах у здоровых и при инфильтративном, фиброзно-кавернозном туберкулезе и туберкуломах легких

Таблица 5

Группы	Здоровые	Туберкулез		
		Инфильтрат, N = 25	ФКТ, N = 10	Туберкулома, N = 42
Аминокислоты (% к общему количеству)	Контроль, N = 10	Инфильтрат, N = 25	ФКТ, N = 10	Туберкулома, N = 42
Таурин	6,99 (4,82—8,65)	0,97* (0,42—1,52)	1,12* (0,68—2,54)	1,73* (0,89—2,65)
Аргинин	0,79 ("следы"—1,22)	1,05 (0,67—1,45)	1,50* (0,85—2,68)	1,38* (0,74—2,58)

Примечание. * — различие между группами статистически значимо (p<0,05): 1) контроль — инфильтративный туберкулез (таурин); 2) инфильтративный туберкулез — ФКТ (таурин); 3) инфильтративный туберкулез — туберкулома (таурин); 4) контроль — инфильтративный туберкулез (аргинин); 5) контроль — ФКТ (аргинин); 6) контроль — туберкулома (аргинин)

содержании отмеченных аминокислот и их производных в лейкоцитах.

При инфильтративном туберкулезе в плазме крови в 2 раза снижается количество таурина, а в лейкоцитарной взвеси — более чем в 6 раз (статистически значимо в обоих случаях). При ФКТ и туберкуломах количество таурина в плазме даже несколько превышает контрольный уровень, чем в контроле, но в лейкоцитарной взвеси, напротив, в 4—6 раз снижено по сравнению с нормой. Имеется тенденция к снижению по сравнению с контролем и в плазме и в лейкоцитах других серосодержащих аминокислот: метионина и цистеина, хотя различия статистически незначимы. Это может быть связано с интенсификацией катаболических процессов при туберкулезе [14, 17].

Предшественником оксида азота является аминокислота аргинин. Повышенные количества аргинина блокируют образование NO в фагоцитах [3, 5, 6, 12], что может ограничивать интенсивность апоптоза и снижать остроту и катаболические процессы хронического специфического воспаления. При сниженных антиоксидантных ресурсах понижение генерации оксида азота характерно для ФКТ. Уровень перекисей липидов в плазме крови возрастает при инфильтративном туберкулезе в 1,5 раза, а при ФКТ — почти в 2 раза (статистически значимо в обоих случаях).

Значительное угнетение антиоксидантной системы и окисление глутатиона при усиленном образовании NO может приводить к чрезмерной активизации апоптоза и усилению катаболических процессов [1—6]. Очевидно, с этим связаны компенсаторные механизмы подавления генерации NO при формировании продуктивных форм специфического туберкулезного процесса.

Таким образом, существенные изменения количества рассматриваемых метаболитов в плазме крови и лейкоцитах при различных формах туберкулеза, отражают глубокую перестройку на функционально-метаболическом уровне при переходе острой и подострой фазы туберкулезного процесса (инфильтративный туберкулез) в фазу хроническую (ФКТ и туберкуломы) и имеют регуляторно-адаптивное значение. Развитие туберкулезной инфекции с преобладанием эксудативных явлений специфического процесса сопряжено с усилением генерации АФК и ВСА в лейкоцитах крови при усилении свободнорадикальных процессов и снижении антиоксидантных ресурсов в организме в целом.

Наш опыт применения таурина при туберкулезе (в эксперименте и клинике) свидетельствует о том, что увеличение антиоксидантных ресурсов организма способствует улучшению переносимости противотуберкулезной терапии и повышению эффективности лечения в целом [21].

Результаты исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Полученные результаты позволяют утверждать, что в диагностике и оценке характера туберкулезного процесса с успехом может быть использовано определение функционально-метаболических особенностей лейкоцитов крови и плазмы (фагоцитоз, суммарные перекиси липидов, БУРСТ-ТЕСТ, АФК, ВСА и их производные), а также количество аминокислот — таурина и аргинина в плазме крови и лейкоцитах.

2. При ограниченных формах туберкулеза снижение функционально-метаболических процессов лейкоцитов крови предупреждает чрезмерное образование АФК и ВСА, что можно рассматривать как механизм защиты.

3. Для ФКТ характерно нарастание АФК в плазме и лейкоцитах крови, а также повышение уровня аргинина и снижение количества производных оксида азота в лейкоцитах, что можно рассматривать как один из механизмов защиты и повреждения.

4. Факторы, стабилизирующие мембраны лейкоцитов и повышающие антиоксидантный ресурс (таурин, глутатион, глутамат, аргинин), могут повышать устойчивость организма к туберкулезной инфекции.

References

- Zavoronok T.V. et al. Infringement of oxidative metabolism in acute inflammatory diseases. *Klin. Lab. Diagn.* 2006; (12): 10(4). (in Russian)
- Novitsky V.V. Modulation of apoptosis of mononuclear cells under oxidative stress. *Bull. Eksp. Biol. I Med.* 2008; 145(3): 251-4. (in Russian)
- Golikov P.P. *Nitric oxide in the hospital emergency diseases. [Oksid azota v klinike neotloznykh zabolevaniy]*. Moscow: MEDPRAKTIKA; 2004. (in Russian)
- Zagrebel'skaya I.V. The use of nitric oxide in the practice of medicine. *Mezhdunar. Medits. Zurn.* 2009; (4): 100-4. (in Russian)
- Ivanova A.S. Effect of anti-oxidants and nitric oxide on activity of peritoneal macrophages in normal pregnancy rats. *Bull. Eksp. Biol. I Med.* 2012; (11): 532-34. (in Russian)
- Ivashkin V.T., Drapkina O.M. *Clinical significance of nitric oxide and heat shock proteins. [Klinicheskoe znachenie oksida azota I belkov teplovogo shoka]*. 2 ed. Moscow: GEOTAR- MEDIA; 2012. (in Russian)
- Kaminskaya G.O. The change in the level of blood neutrophils and mononuclear cells of nitric oxide in patients with pulmonary tuberculosis different over. *Problemy tuberkuleza I bolezney legkikh.* 2004; (8): 41-5. (in Russian)
- Kaminskaya G.O. Oksid nitrogen — its biological role and involvement in the pathology of Respiratory. *Problemy tuberkuleza I bolezney legkikh.* 2004; (6): 3-11. (in Russian)
- Plekhova N.G. The bactericidal activity of phagocytes. *Zurnal mikrobiol.* 2006; 6: 89- 96. (in Russian)
- Sakharova I.J. Indicators of acquired immunity and cationic proteins of neutrophils in pulmonary tuberculosis. *Problemy tuberkuleza I bolezney legkikh.* 2003; (10): 50-2. (in Russian)

11. Tyulkova T.E. *Immunologic features of tuberculosis infection at different stages of its. [Immunologicheskie osobennosti tuberkuleznoy infektsii na razlichnykh etapakh ee razvitiya]*. Tyumen: City — the press; 2008. (in Russian)
12. Proskuryakov S.Y. Nitric oxide in the mechanisms of the pathogenesis of intracellular infections. *Immunologiya*. 2000; 4: 9-20. (in Russian)
13. Sakhno L.V. Involvement of nitric oxide in the development of tuberculin anergy in patients with pulmonary tuberculosis. *Probl. tuberkuleza*. 2001; 8: 42-5. (in Russian)
14. Krivoruchko N.S. The sulfur content in the urine of patients with pulmonary tuberculosis. *Probl. tuberkuleza*. 1984; 11: 64-6. (in Russian)
15. Sakhno L.V. Involvement of nitric oxide in the development of infection. *Bull. Exper. Biol. I med.* 2000; 45(10): 12-4. (in Russian)
16. Nefedov L.I. *Taurine: biochemistry, pharmacology, medical use. [Taurin: biokhimiya, farmakologiya, meditsinskoe primeneniye]*. Grodno; 1999. (in Russian)
17. Guerra C. Control of Mycobacterium tuberculosis growth by glutathione danded natural killer cells. *Clin. and Immun.* 2012; 168(1): 148-52.
18. Grimbble F.R., The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans. *J. Nutria*. 2006; 136(6): 1660-5.
19. Olin to S.C.F. Arginine induces GH gene expression dye activating NOS/NO signaling in rat isolated hemi-pituitaries. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2012; 45(11): 1066-73.
20. Park K.G.M. Stimulation of lymphocyte natural cytotoxicity by L-arginine. *Lancet*. 1991; 337(8742): 645-6.
21. Pavlov V.A., Sabadash E.V. Prospects for the use of amino acids — adaptogens in pathogenetic therapy of a number of pathological conditions of the organism. *Probl. tuberkuleza*. 2002; 11: 28-31. (in Russian)

Сведения об авторах:

Сабадаш Елена Венедиктовна, канд. мед. наук

Скорняков Сергей Николаевич, доктор мед. наук, проф., директор ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России

Павлов Владимир Александрович, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России

Ершова Анастасия Викторовна, науч. сотр. ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России

Егоров Евгений Анатольевич, канд. мед. наук, зам. директора по лечебно-диагностической работе ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России

© Пальцын А.А., Комиссарова С.В., 2016
УДК 616-092

Пальцын А.А.^{1,2}, Комиссарова С.В.¹

Двухъядерные нейроны Пуркинье

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

² — ГБОУ дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия последипломного образования», 123995, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1

До конца XX века двухъядерные нейроны Пуркинье у грызунов и человека были предметом случайных находок. Однако уже тогда было замечено, что такие клетки чаще обнаруживаются у старых и больных млекопитающих. Поэтому предполагали, что появление второго ядра имеет регенераторное значение — компенсацию возрастной или патогенной утраты клеток Пуркинье. В 2003 году в исследованиях по трансплантации стволовых клеток были сделаны первые наблюдения, относящиеся к механизму появления второго ядра в нейроне Пуркинье. В трансгендерном исследовании у человека и в трансгенных экспериментах на мышах показано, что костномозговые клетки донора могут сливаться с нейронами Пуркинье реципиента и таким образом передавать нейрону свое ядро. Очень важно то, что двухъядерные нейроны появляются в старости, как у больных людей, так и у грызунов даже без пересадок. Но в таком случае ни донорская клетка, ни механизм появления второго ядра остаются неясными. Актуальность выяснения этого вопроса увеличивается тем обстоятельством, что литература последних лет доказывает: появление второго ядра есть форма физиологической и репаративной регенерации нейронов Пуркинье.

Ключевые слова: нейрон Пуркинье; слияние клеток; регенерация нейронов.

Для цитирования: Пальцын А.А., Комиссарова С.В. Двухъядерные нейроны Пуркинье. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 107–113.

Для корреспонденции: Пальцын Александр Александрович, доктор биол. наук, проф., лауреат Государственной премии СССР, гл. науч. сотр. Института общей патологии и патофизиологии РАН, проф. каф. общей патологии и патофизиологии РМАПО, e-mail: lrp@mail.ru

Финансирование. Работа не имела спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.09.2016

Paltsyn A.A.^{1,2}, Komissarova S.V.¹

Binuclear Purkinje neurons

¹ — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow 125315, Russia

² — Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow 125315, Russia

Until the end of the XX century binuclear neurons of Purkinje in rodents and the humans were a subject of casual finds. However already then it was noticed that such cells are in old and sick mammals more often. It is therefore assumed that the appearance of the second nucleus has a regenerative value — compensation age-related or pathogenic loss of Purkinje cells. In 2003, in research on stem cell transplantation was made the first observations related to the mechanism of the appearance of the second nucleus in Purkinje neurons. The transgender studies in humans and in transgenic experiments on mice have shown that bone marrow derived donor cells can fuse with Purkinje neurons of the recipient, thus transfer to neuron its nucleus. It is very important that the binuclear neurons can appear in old and sick people and rodents without transplantation. But in that case neither the donor cell, nor the mechanism of origin of the second nucleus remain not clear. Relevance of clarification of this question increases of the fact that literature of the last years proves: emergence of the second nucleus is a form of physiological and reparative regeneration of neurons of Purkinje.

Keywords: neuron of Purkinje; cell fusion; regeneration of neurons.

For citation: Paltsyn A.A., Komissarova S.V. Binuclear Purkinje neurons. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2016; 60 (4): 107–113. (in Russ.).

For correspondence: Paltsyn A.A., Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow 125315, Russia, e-mail: lrp@mail.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 10.09.2016

О присутствии в мозжечке одиночных клеток Пуркинье с двумя ядрами известно давно. Наиболее раннее сообщение, найденное нами в оригинале, относится к 1928 году [1]. У крыс в возрасте 730 дней и более автор нередко, находил двух- и даже, как он пишет, трехъядерные клетки. У крыс среднего возраста (200 дней) такие клетки не встречались. В 1937 году Andrew [2] описал находки у старых мышей (более 740 дней) двухъядерных нейронов Пуркинье. У животных меньшего возраста таких клеток автор не обнаруживал. Ранние сообщения о двухъядерных клетках Пуркинье у человека связывались авторами этих сообщений с различными патологическими состояниями. Так, Schroder в 1911 г. (цит. по [3]) сообщил о присутствии таких клеток в двух случаях шизофрении. Сам Andrew в 1939 г. при исследовании 40 мозжечков, полученных от людей различного возраста (в том числе от 5 стариков в возрасте 69—80 лет), обнаружил двухъядерные нейроны Пуркинье только у одного: 22-летнего негра, умершего от цереброспинального сифилиса, причем содержание таких клеток составляло «от 3 до 4 процентов» [3]. В проведенном сравнительно недавно исследовании мозжечков людей без невропатологии на присутствие двухъядерных нейронов Пуркинье [4] авторы, просмотрев более 50 000 клеток, обнаружили единственный нейрон с двумя морфологически неразличимыми ядрами. К сожалению, в статье не указывается возраст людей, от которых был получен секционный материал, что снижает информационную значимость наблюдения. Возвращаясь к работе Andrew [3], упоминаем, что, помимо числа ядер, другие морфологические характеристики перикарионов двухъядерных нейронов не отличались от перикарионов одноядерных нейронов. В нескольких случаях автор наблюдал в двухъядерных клетках на близком расстоянии от перикариона раздвоение ствола главного дендрита. Автор указывает на сходство этой особенности с наблюдавшимися им изменениями нейронов Пуркинье у старых мышей [2]. Он объясняет появление двухъядерных клеток амитозом, но цитирует Roussy and Mosinger (цит. по [3]), которые предполагали, что многоядерные нейроны вегетативных ядер гипоталамуса могут возникать путем слияния одноядерных клеток. Уже по этим находкам двухъядерных нейронов у старых и больных млекопитающих можно было предположить, что появление второго ядра может быть выражением регенераторного процесса. Однако тогда ещё не пришло время массового, серьезного и систематического обращения ученых к проблеме регенерации мозга и эти наблюдения были по существу забыты, точнее, не стали развиваться дальнейшими исследованиями.

Возврат к теме двухъядерных нейронов Пуркинье произошел на рубеже XX—XXI веков в связи с неожиданными находками, сделанными в широко развернувшихся тогда исследованиях дифференцировки (трансдифференцировки) стволовых клеток. В очень популярной статье Mezey с сотр. [5] изложили результаты трансплантации костного мозга мышей от доноров — самцов реципиентам — самкам. Авторы описали появление в коре, гипоталамусе, гиппокампе, амигдале клеток, содержащих Y хромосому и меченых нейрональными маркерами. Делается вывод о дифференцировке костномозговых клеток донора в нейроны реципиента. Через 3 года Mezey с другими сотрудниками [6] опубликовала статью, описывающую наблюдения, сделанные на людях, но сходную по схеме исследования (терапевтическая пересадка костного мозга от мужчин женщинам) и по трактовке результатов (дифференцировка костномозговых клеток в нейроны). Наблюдали совмещение нейронального маркера (NeuN) и Y хромосомы в клетках коры реципиентов. Такую далеко зашедшую дифференцировку стали называть трансдифференцировкой, имея в виду, что в своем развитии мезодермальная клетка костного мозга превратилась в эктодермальный нейрон. Клетка в развитии «пересекла границу» зародышевых листков. Принцип описанных трансгендерных пересадок, основанный на опознании в организме самок клеток или потомков клеток самца, был использован для создания метода трансгенных пересадок. Одновременно со статьей Mezey с сотрудниками 2000 года (в том же номере журнала Science) была опубликована работа Brazelton et al. [7], в которой трансгенным методом доказывается трансдифференцировка костномозговой клетки в нейрон

Эксперименты производятся чаще на мышах и называются трансгенными потому, что все клетки мышей-доноров содержат трансген: метаболически инертное, но легко обнаруживаемое вещество, присутствие которого выдает донорское происхождение любой исследуемой клетки в теле реципиента. Чаще всего в качестве трансгена используется белок с зеленой флуоресценцией (green fluorescent protein — GFP). Это природный белок, обеспечивающий зеленую биолюминесценцию одного из видов медуз. После перенесения его генно-инженерным методом в яйцеклетку мыши [8] все клетки родившегося мышонка, кроме эритроцитов и волос, светятся зеленым цветом под лучом возбуждения. Казалось, что какие бы превращения не претерпела донорская клетка в организме реципиента, её всегда можно будет узнать по зеленой флуоресценции «зеленые клетки».

Эксперимент осуществляется следующим образом. Взрослых мышей реципиентов облучают в смертельной дозе. Затем вводят им костный мозг — bone

marrow-derived cells (BMDC) от взрослых GFP-положительных доноров. Для подавления реакции трансплантат — против хозяина реципиенты получают большие дозы иммунодепрессантов. Естественно после таких манипуляций у реципиентов находят много зеленых клеток крови. Не так естественно и очевидно, но, тем не менее, встречались зеленые дифференцированные клетки других тканей. Чтобы не отвлекаться от темы, скажем только о мозге. Первые известия о том, что BMDC, развиваясь в теле реципиента могут пересекать рубежи зародышевых листков и из мезодермальных превращаться в эктодермальные клетки мозга появились на рубеже веков в 2000 году [5, 7].

В 2001 году опубликована статья Priller et al. [9], обнаруживших в мозжечке реципиентов через год после трансгенной пересадки зеленые нейроны Пуркинье. Объяснение Priller et al. полностью соответствовало представлениям 2001 года. Они сочли, что мезодермальная BMDC стала эктодермальным нейроном. Иными словами, BMDC прошла столь большой и сложный путь развития, что превратилась в клетку другого зародышевого листка — трансдифференцировалась. Объяснение казалось обоснованным: ведь нейрон зеленый, следовательно, он — ставшая нейроном BMDC. Авторы не смутило то, что чудесное превращение произошло не с эмбриональной клеткой, отличающейся повышенной пластичностью, а с клеткой взрослого животного и в организме взрослого животного с давно (в эмбриональном периоде) сформированным мозжечком. Но, повторяем, эта трактовка не была плодом пылкого воображения маленькой группы людей — авторов статьи. В то время так думала большая часть научного сообщества. Конечно, до сих пор не изжитому, а в то время безудержному, стремлению всеместно пересаживать стволовые клетки, Priller с соавторами рекомендуют трансплантацию BMDC для лечения в клинике двигательных расстройств. Рекомендация смелая, если не сказать легкомысленная. Во-первых, потому, что при исследовании целого мозжечка находили всего несколько зеленых нейронов Пуркинье, а во-вторых, — условия трансгенного эксперимента бесконечно далеки от реальных условий развития болезней человека.

Серьезный удар по идее постнатального нейрогенеза, а заодно и по популярным и слишком оптимистично оцениваемым представлениям о трансдифференцировке нанесла серия публикаций появившаяся в 2002—2003 гг. [10—16]. В этих статьях было заявлено, что стволовая клетка может сливаться с дифференцированной клеткой различных тканей. По этой причине «классическое» доказательство пластичности вообще и, в частности, пластическое появление во взрослом мозге нейрона, «трансдиффе-

ренцировавшегося» из BMDC оказались артефактом. Открытая возможность слияния BMDC дает другое, не столь фантастичное объяснение результатов, якобы демонстрирующих трансдифференцировку. BMDC не превратилась в дефинитивную клетку. У Priller с сотрудниками — это нейрон Пуркинье, отличавшийся не только характерной топографией и морфологией, но и экспрессировавший маркеры дифференцированного нейрона Пуркинье: декарбоксилазу глутаминовой кислоты, калбиндин. Все эти специфические особенности «взрослого» нейрона Пуркинье не были созданы самостоятельно BMDC. Она просто слилась с дифференцированным нейроном и передала ему свой маркер — зеленый цвет. Следует оговориться, что выше излагались результаты экспериментов *in vivo*. *In vitro* можно изменением условий культивирования добиться трансдифференцировки и превращения мезенхимальной стволовой клетки костного мозга в клетку любого зародышевого листка [17].

Указанные работы 2002—2003 гг. имеют принципиальное значение не только в учении о стволовых клетках. Эти статьи привлекли внимание научного сообщества к двум важным для нашей темы о нейронах Пуркинье моментам: способности этих нейронов сливаться с другими клетками и влиянии второго ядра на функцию клетки. Оказалось, что BMDC могут участвовать в регенерации и развитии не только путем дифференцировки и трансдифференцировки в зрелые клетки, но и путем слияния, с дифференцированными клетками поврежденного или развивающегося органа.

Уже первая группа исследователей, обнаружившая слияние BMDC с нейронами Пуркинье [10], предположила, что добавление генетического материала — второго ядра может иметь поддерживающее или восстанавливающее значение для этих нейронов. Принципиальная возможность регенерации путем слияния с иными (гетеротипическими) клетками была убедительно доказана уже упоминавшейся нами работой [13], в которой сохранение жизни и здоровья животных при смертельной генетической болезни достигалось слиянием BMDC с гепатоцитами.

Мыши с мутацией гена фумарилацетоацетат гидролазы (*Fah*^{-/-}) страдают тирозинемией и погибают, если им не вводить лекарство (НТВС — нитизинон). Таким мышам после облучения вводили BMDC от диких (*Fah*^{+/+}) мышей. Через 4—5 мес. после трансплантации реципиенты выглядели здоровыми (без введения нитизинона), билирубин сыворотки снижался практически до нормы. В печени макроскопически были видны множественные узлы, микроскопически сходные с нормальной печеночной тканью. Гистохимическое исследование показало, что большинство гепатоцитов имели нормальное строение

и экспрессировали Fah. Отсутствующий ген Fah гепатоциты могли получить только в результате слияния с несущей этот ген клеткой донора. Все собственные клетки реципиента, в том числе и стволовые, были Fah^{-/-}. После слияния под влиянием цитоплазмы гепатоцита происходило репрограммирование генома слившейся с гепатоцитом клетки. Гемопоэтический донорский геном перестраивался на гепатоцит-специфическую экспрессию. «Молчащий» в BMDC ген Fah начинал экспрессироваться, а экспрессия пан-гемопоэтического маркера CD45 прекращалась. Кроме репрограммирования в этом эксперименте и морфологически, и по состоянию животных был доказан четко выраженный, спасающий жизнь репаративный эффект слияния клеток. Механизм репарации был следующий. Болезнь обуславливалась недостатком структур (генов Fah), необходимых для обеспечения функции органа. Слившиеся стволовые или прогениторные клетки внесли недостающие структуры (гены) в специфические клетки органа — гепатоциты. Под влиянием специализированной цитоплазмы произошло репрограммирование внесенных ядер, соответствующее функции резидентных специализированных партнеров по слиянию. Репрессированные до слияния гены Fah стволовых клеток после слияния дерепрессировались и тем довели в органе число ранее отсутствующих структур до уровня, обеспечивающего сохранение жизни и выздоровление животного.

Регенераторная роль слияний клеток с нейронами Пуркинье может быть не так эффективно установлена, как в цитированной выше работе Vassilopoulos et al. [13], но, тем не менее, имеет в настоящее время немало поводов для доверия. В исследовании Weimann et al. [15] показано, что в гетерокарионе: нейрон Пуркинье — BMDC происходит репрограммирование ядра BMDC. Оно увеличивается в размере, в нем становится больше дисперсного хроматина и активируется специфичный для нейронов Пуркинье ген. Иными словами, появляется дополнительная структура, идентичная или, по крайней мере, неотличимая по какому-то геному от ядра нейрона Пуркинье. Увеличение числа структур — классический признак регенерации. Число гетерокарионов увеличивалось по мере старения животных, а также при развитии у них мышинной модели множественного склероза — аутоиммунного энцефаломиелимита [18]. Увеличение у старых и больных животных числа двухъядерных, способных к большей функциональной нагрузке [19] нейронов — серьёзное указание на регенераторную роль слияния клеток.

Все вышеупомянутые исследования слияний клеток с нейронами Пуркинье были выполнены методом трансгенных пересадок. При многих достоинствах этого метода, он имеет и существенные недостатки.

1. Все результаты получены в трансгенных экспериментах, резко меняющих состояние животных (облучение в летальной дозе, большие дозы иммунодепрессантов).

2. Низкое число слияний (1—2 на миллион просмотренных клеток). Маловероятно, чтобы столь редкое событие оказывало репаративное действие.

3. В слияниях участвуют только донорские костномозговые клетки. Роль стволовых клеток мозга или любых других эндогенных клеток невыяснена. Наверняка стволовые клетки реципиента репрессированы, если не уничтожены.

4. Облучение нарушает гематоэнцефалический барьер [20, 21], поэтому нельзя отвергнуть предположение, что костномозговые клетки проникли в мозг благодаря облучению, а у интактных животных проникновение невозможно.

Всё это делает трансгенный эксперимент далеким от реальных патологических состояний у людей и животных и совсем непригодным для суждения о закономерностях нормального онтогенеза.

В 2007 году Wiersema с соавторами [22] помимо трансгенного эксперимента, обнаружившего увеличение числа слияний BMDC с нейронами Пуркинье после облучения, исследовали мозжечки интактных мышей разного возраста. У молодых животных авторы не нашли двухъядерных нейронов, в мозжечках 12-месячных мышей содержание двухъядерных нейронов составило 1,44%.

Группа итальянских исследователей [23] сочетала возможности трансгенного эксперимента с изучением нейронов Пуркинье в онтогенезе интактных мышей и в условиях репаративной регенерации при селективном повреждении этих нейронов. Каждый из этих экспериментальных подходов позволил авторам получить ценные данные. В трансгенном эксперименте они наблюдали уже известный факт: появление зеленых нейронов Пуркинье у реципиентов в результате слияния с GFP-мечеными донорскими BMDC. После вторичного облучения реципиентов содержание в их крови GFP-меченных BMDC снижалось почти до нуля, следовательно, образование новых зеленых нейронов Пуркинье становилось невозможным. Однако и через 7 мес. содержание зеленых нейронов Пуркинье в мозжечках реципиентов было не ниже, чем перед вторичным облучением. Этим экспериментом Magrassi с соавторами доказали, что в результате слияния образуются стабильные, длительно живущие нейроны. При селективном повреждении нейронов Пуркинье количество двухъядерных клеток среди них увеличивалось. В этой работе анализировали в конфокальном микроскопе вибраторные срезы мозжечка мышей в возрасте 2 и 18 мес., не подвергавшихся каким-либо воздействиям. У старых живот-

ных обнаружили в среднем 4,97% двухъядерных клеток Пуркинье. Клетки — доноры второго ядра остались неизвестны. У интактных двухмесячных животных двухъядерных нейронов не нашли. Однако при избирательном повреждении нейронов Пуркинье и стимуляции микроглии двухъядерные нейроны появлялись и у молодых животных.

Авторы почему-то заключают свою статью фразой, что физиологическое значение этих наблюдений неизвестно. Формально они правы. Но, если иметь в виду, что каждый эксперимент, тем более с такими новыми и интересными результатами, должен способствовать развитию науки, систематизации вновь полученных сведений, появлению обобщающих идей, то нельзя не обратить внимания на следующее. Второе ядро в нейроне — это новая дополнительная структура, позволяющая выполнять дополнительную функцию, т.е. не что иное, как регенерация. Физиологическая регенерация, если гибель ранее существовавших структур не превышает норму или репаративная регенерация, если гибель структур ускорена патологическим процессом. На наш взгляд, данные Magrassi с сотрудниками полностью соответствуют понятиям о физиологической (появление двухъядерных клеток только в позднем онтогенезе) и репаративной (появление уже в раннем онтогенезе двухъядерных нейронов Пуркинье при их избирательном разрушении) регенерации. Конечно, для доказательства регенераторного значения обсуждаемых фактов нужны дополнительные исследования, однако предположение о таком значении представляется очевидным.

Большинство находок двухъядерных нейронов Пуркинье сделано в трансгенных экспериментах, который, наряду с внесением генетически меченых клеток, предусматривает облучение реципиента, т.е. повреждение и поэтому резонным представляется предположение о репаративном значении слияния клеток, появления в нейроне второго ядра [24]. Регенераторную суть слияний изучали в трансгенном эксперименте с дополнительным, помимо обусловленного самой схемой эксперимента (иммуносупрессия), повреждением мозга [25]. Мышам внутривенно вводили мезенхимальные стволовые клетки человека и вызывали аутоиммунный энцефаломиелит. Нейроны Пуркинье слившиеся с мезенхимальными клетками обнаруживали иммуноцитохимической меткой по присутствию человеческого антигена. В контроле, без энцефалита содержание таких клеток было $0,147 \pm 0,046\%$. У мышей с энцефалитом наблюдали почти десятикратное увеличение содержания меченых нейронов Пуркинье: $1,454 \pm 0,629\%$ ($P < 0,01$).

В следующем году было опубликовано исследование феномена слияний нейронов Пуркинье с VMDC в условиях избирательной недостаточности (без вос-

паления и реактивного глиоза) этих клеток [26]. У мышей существует рецессивная мутация выражающаяся дегенерацией клеток Пуркинье. Гомозиготные по этой мутации животные умирают рано. У гетерозиготных потеря клеток Пуркинье проявляется в значительно более позднем возрасте. Авторы обнаружили многократное увеличение числа слившихся с VMDC нейронов Пуркинье у гетерозигот на 150-й и 300-й день сравнительно с животными, не содержащими мутантного гена.

Одним из дополнительных исследований, вновь указавшим на регенераторное значение появление двухъядерных нейронов Пуркинье и уже на клиническом материале стала работа Kemp с сотрудниками [27]. Авторы провели сравнительное исследование 6 мозжечков, полученных от умерших больных множественным склерозом (диагноз установлен клинически и подтвержден аутопсией) и пяти мозжечков людей, умерших не от неврологических болезней. При множественном склерозе содержание двухъядерных нейронов Пуркинье составило 0,376%, в контроле 0,024%. При множественном склерозе 90,87% двухъядерных нейронов имели различные ядра: одно — типичное ядро нейрона Пуркинье большое с дисперсным хроматином, другое — маленькое с конденсированным хроматином. В остальных двухъядерных клетках оба ядра были нейронального типа. Увеличение числа двухъядерных нейронов Пуркинье при множественном склерозе авторы рассматривают как признак регенерации и даже как перспективу улучшения функции мозжечка *in vivo*. Перспектива видится в том, что пересадками VMDC можно превращать какую-то долю нейронов в Пуркинье в двухъядерные и тем увеличивать функциональные возможности популяции этих клеток, пострадавшей в результате возрастных или патогенных повреждений. Принципиально сходное направление клеточной терапии, но ориентированное на внесение в нейрон Пуркинье не просто второго ядра, но ядра с геном, исправляющим патологическое состояние было испытано Chen с сотр. [28]. Таким приемом авторам удалось добиться меньших морфологических повреждений в нейронах Пуркинье и большее сохранение их числа при врожденной спино-церебральной атаксии у мышей.

Следует отметить, что клеточной терапии при патологии нейронов Пуркинье, конечно, свойственны «детские болезни», характерные для всего современного направления клеточной терапии. Основная идея направления — получить клетки из одного места и сразу или, нарастив число клеток в культуре, а иногда и добившись определенного уровня дифференцировки «воспитав» в культуре, ввести их в другое место того же или другого организма [29]. Мы вовсе не пытаемся такую стратегию критиковать. Она обусловлена

благородным стремлением уже сегодня, с современным багажом знаний, облегчать болезни людей. Однако не следует забывать, что такое положение медицинской науки и практики вынужденное и есть приспособление к деятельности в условиях недостаточного знания. Понятно, что успех медицинских вмешательств возможен только при условии совпадения их с естественными, сложившимися в эволюции механизмами регенерации. Стволовые клетки есть в любом органе и если в органе развился патологический процесс, значит, деятельность эндогенных стволовых клеток по какой-то причине не обеспечивает нормальную функцию. Истинно этио-патогенетической терапия будет только в том случае, когда врач будет знать, что произошло с эндогенными клетками и как исправить это положение.

Возвращаясь от общих рассуждений к обсуждаемой теме, напоминаем о неоднократно описанном у животных и у людей появлении двухъядерных нейронов в нормальном онтогенезе. Если уж научное сообщество склонно и, по существу, единодушно воспринимать этот факт как проявление регенерации, то он не может быть ничем другим как физиологической регенерацией. Это очень важно. Механизмы этого явления заслуживают самого тщательного изучения, поскольку репаративная регенерация не имеет собственных механизмов и отличается от физиологической только количественно. Однако сегодня при популярности исследований слияния нейронов Пуркинью с VMDC в трансгенных экспериментах остается неизвестным и, по нашим сведениям, не изучаемым вопрос о том, какая клетка отдает своё ядро нейрону Пуркинью в естественных условиях, когда двухъядерные клетки появляются, без специальных воздействий у старых грызунов и людей. А как раз этот аспект исследований представляется наиболее значимым и перспективным, если иметь в виду, что деятельность врача должна соответствовать природным механизмам регенерации. Огромные, одни из самых больших в организме, каждый из которых имеет порядка 200 000 связей с другими нейронами [30], нейроны Пуркинью формируются в эмбриогенезе [31] и не пополняются у взрослых млекопитающих даже из эндогенных нейральных стволовых клеток. Выращивание такой клетки в уже сформированном мозге с установлением всех необходимых связей даже из местных предшественников и по сложившемуся в эмбриогенезе механизму кажется большой фантастикой. Тем более, по-видимому, не стоит пытаться их вырастить «рассудку вопреки, наперекор стихиям» из любых введенных в организм клеток. В этих условиях выяснение механизмов их естественной регенерации захватом второго ядра представляется более реалистичным и более близким к интересам клиници на направлением работы.

References

1. Inukai T. On the loss of Purkinje cells, with advancing age, from the cerebellar cortex of the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 1928; 45:1-31.
2. Andrew W. The effects of fatigue due to muscular exercise on the Purkinje cells of the mouse, with special reference to the factor of age. *Ztschr f Zellforschung u Mikr. Anat.* 1937; 27: 534-55.
3. Andrew W. Origin and significance of binucleate Purkinje cells in man. *Arch. Pathol.* 1939; 28: 821-26.
4. Nern C., Wolff I., Macas J., von Randow J., Scharenberg C., Priller J. et al. Fusion of hematopoietic cells with Purkinje neurons does not lead to stable heterokaryon formation under noninvasive conditions. *J. Neurosci.* 2009; 29(12): 3799-807.
5. Mezey E., Chandross K.J., Harta G., Maki R.A., McKercher S.R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science.* 2000; 290(5497): 1779-82.
6. Mezey E., Key S., Vogelsang G., Szalayova I., Lange G.D., Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2003; 100(3): 1364-9.
7. Zavelton T.R., Rossi F.M., Keshet G.I., Blau H.M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science.* 2000; 290: 1775-9.
8. Okabe M., Ikawa M., Kominami K., Nakanishi T., Nishimune Y. Green mice as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters.* 1997; 407: 313-9.
9. Priller J., Persons D.A., Klett F.F., Kempermann G., Kreutzberg G.W., Dirnagl U. Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J. Cell Biol.* 2001; 155: 733-8.
10. Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J.M., Fike J.R., Lee H.O., Pfeffer K. et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature.* 2003; 425: 968-73.
11. Gussoni E., Bennett R.R., Muskiewicz K.R., Meyerrose T., Nolte J.A., Gilgoff I. et al. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.* 2002; 110: 807-14.
12. Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Masterlitz D.M., Nakano Y. et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature.* 2002; 416: 542-5.
13. Vassilopoulos G., Wang P.R., Russell D.W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature.* 2003; 422: 901-4.
14. Wang X., Willenbring H., Akkari Y., Torimaru Y., Foster M., Al-Dhalimy M. et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature.* 2003; 422: 897-901.
15. Weimann J.M., Charlton C.A., Brazelton T.R., Haskman R.C., Blau H.M. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003a; 100: 2088-93.
16. Ying Qi-L., Nichols J., Evans E.P., Smith A.G. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature.* 2002; 416: 545-8.
17. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002; 418: 41-9.

18. Johansson C.B., Youssef S., Koleckar K., Holbrook C., Doyonnas R., Corbel S.Y. et al. Extensive fusion of haematopoietic cells with Purkinje neurons in response to chronic inflammation. *Nature cell biology*. 2008; 10: 575-83.
19. Gregory T.R., Hebert P.D. The modulation of DNA content: proximate causes and ultimate consequences. *Genome Res*. 1999; 9: 317-24.
20. Rubin P., Gash D.M., Hansen J.T., Nelson D.F., Williams J.P. Disruption of the blood-brain barrier as the primary effect of CNS irradiation. *Radiother. Oncol*. 1994; 31: 51-60.
21. Davoust N., Vauillat C., Androdias G., Nataf S. From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol*. 2008; 29: 227-34.
22. Wiersema A., Dijk F., Dontje B., van der Want J.J., de Haan G. Cerebellar heterokaryon formation increases with age and after irradiation. *Stem Cell Res*. 2007; 1(2): 150-4.
23. Magrassi L., Grimaldi P., Ibatici A., Corselli M., Ciardelli L., Castello S. et al. Induction and survival of binucleated Purkinje neurons by selective damage and aging. *J. Neurosci*. 2007; 27(37): 9885-92.
24. Nygren J.M., Liuba K., Breitbach M., Stott S., Thoren L., Roell W. et al. Myeloid and lymphoid contribution to non-haematopoietic lineages through irradiation-induced heterotypic cell fusion. *Nat. Cell Biol*. 2008; 10: 584-92.
25. Kemp K., Gordon D., Wraith D.C., Mallam E., Harfield E., Uney J. et al. Fusion between human mesenchymal stem cells and rodent cerebellar Purkinje cells. *Neuropathol. Appl. Neurobiol*. 2011; 37(2): 166-78.
26. Diaz D., Recio J.S., Weruaga E., Alonso J.R. Mild cerebellar neurodegeneration of aged heterozygous PCD mice increases cell fusion of Purkinje and bonemarrow-derived cells. *Cell Transplant*. 2012; 21(7): 1595-602.
27. Kemp K., Gray E., Wilkins A., Scolding N. Purkinje cell fusion and binucleate heterokaryon formation in multiple sclerosis cerebellum. *Brain*. 2012; 135(Pt 10): 2962-72.
28. Chen K.A., Cruz P.E., Lanuto D.J., Flotte T.R., Borchelt D.R., Srivastava A. et al. Cellular fusion for gene delivery to SCA1 affected Purkinje neurons. *Mol. Cell Neurosci*. 2011; 47(1): 61-70.
29. Kolokoltsova T.D., Saburina I.N., Rybakov A.S. Cell culture as a unique model for research in modern biology and medicine. *Patogenez*. 2013; 11(2): 17-25. (in Russian)
30. Tyrrell T., Willshaw D. Cerebellar cortex: its simulation and the relevance of Marr's theory. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*. 1992; 336: 239-57.
31. Zecevic N., Rakic P. Differentiation of Purkinje cells and their relationship to other components of developing cerebellar cortex in man. *J. Comp. Neurol*. 1976; 167: 27-47.

Сведения об авторах:

Комиссарова Светлана Владимировна, канд. биол. наук, науч. сотр. НИИОПП РАН

© Коллектив авторов, 2016
УДК 57+61

Колмычкова К.И.¹, Желанкин А.В.², Карагодин В.П.³, Орехов А.Н.^{1,4}

Митохондрии и воспаление

¹ — НИИ атеросклероза, Инновационный центр Сколково, 143025, Сколково, Московская область, ул. Новая, 100

² — ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России», 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15 а

³ — Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова, 117997, Москва, Стремянный переулок, 36

⁴ — ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Эндосимбиотическая теория происхождения митохондрий способствовала исследованиям их роли в активации иммунной системы, воспалении и патогенезе воспалительных заболеваний. Так называемые митохондриальные «образы опасности», ассоциированные с повреждением (mitochondrial damage-associated molecular patterns, mtDAMPs), являются одними из ряда подобных «образов опасности», которые представляют из себя эндогенные молекулы и в случаях повреждения или гибели клетки активируют воспалительные реакции. Активация клеток иммунной системы с помощью митохондриальных «образов опасности» вызывается митохондриальными N-формил пептидами, митохондриальным кардиолипином, АТФ, митохондриальной ДНК (мтДНК) и активными формами кислорода (АФК). При митохондриальной дисфункции образование mtDAMPs внутри клетки способствует распознаванию этой клетки образ-распознающими рецепторами (pattern recognition receptors, PRRs) врожденного иммунитета. Митохондрии способны воспринимать сигналы опасности инициации воспаления за счет активизации и управления врожденной иммунной системой. В данном обзоре анализируется информация о связи рецепторов иммунного сигнала (Toll-подобные рецепторы (TLR); RIG-1-подобные рецепторы (RLR); NOD-подобные рецепторы (NLR)) с функциями митохондрий и обсуждается роль митохондрий в иницировании и развитии воспаления.

Ключевые слова: воспаление; митохондрии; митохондриальная ДНК; Toll-подобные рецепторы; RIG-1-подобные рецепторы; NOD-подобные рецепторы.

Для цитирования: Колмычкова К.И., Желанкин А.В., Карагодин В.П., Орехов А.Н. Митохондрии и воспаление. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 114—121.

Для корреспонденции: Колмычкова Кира Ивановна, мл. науч. сотр., e-mail: kurruccha@rambler.ru

Финансирование: Работа поддержана грантом РФФИ (проект 15-34-50064).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Kolmychkova K.I.¹, Zhelankin A.V.², Karagodin V.P.³, Orekhov A.N.^{1,4}

Mitochondria and inflammation

¹ — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Centre; 143025, Russia, Moscow Region, Skolkovo, Novaya st., 100

² — Federal State Budgetary Institution «Russian Cardiology Research and Production Complex», Ministry of Health of the Russian Federation; 121552, Russia, Moscow, 3th Cherepkovskaya st., 15-a

³ — Plekhanov Russian University of Economics; 117997, Russia, Moscow, Stremyanny Pereulok, 36

⁴ — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences; 125315, Russia, Moscow, Baltiyskaya st., 8

Endosymbiotic theory of mitochondrial origin contributed to research the role of mitochondria in the immune system activation, inflammation and the pathogenesis of inflammatory diseases. Factors that are referred to as mitochondrial damage-associated molecular patterns (mtDAMPs) are one of a number of DAMPs, which are an endogenous molecules that activates an inflammatory response in case of cell damage or death. Activation of the immune system cells via mtDAMPs is caused by mitochondrial N-formyl peptides, mitochondrial cardiolipin, ATP, mitochondrial DNA (mtDNA) and reactive oxygen species (mROS). In mitochondrial dysfunction, mtDAMPs release within the cell contributes to the recognition of the cell by pattern recognition receptors (PRRs) of innate immunity. Mitochondria are able to perceive signals of inflammation initiating danger by activating and managing the innate immune system. This review provides the information on the relationship of the immune signaling receptors (Toll-like receptors (TLR); RIG-1-like receptors (RLR); NOD-like receptors (NLR)) with mitochondrial functions and describes the role of mitochondria in the initiation and development of inflammation.

Keywords: inflammation; mitochondria; mitochondrial DNA; (NOD)-like receptors; RIG-1-like receptors; Toll-like receptors.

For citation: Kolmychkova K.I., Zhelankin A.V., Karagodin V.P., Orekhov A.N. Mitochondria and inflammation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 114—121. (in Russ.).

For correspondence: Kira I. Kolmychkova, Junior Researcher, Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Centre; 143025, Russia, Moscow Region, Skolkovo, Novaya st., 100; e-mail: kirruccha@rambler.ru

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

Funding. This work was supported by grant RFFI (project 15-34-50064).

Information about authors:

Kolmychkova K.I. <http://orcid.org/0000-0002-2953-5901>

Zhelankin A.V. <https://orcid.org/0000-0002-3014-2005>

Karagodin V.P. <http://orcid.org/0000-0003-0501-8499>

Orekhov A.N. <https://orcid.org/0000-0002-6495-1628>

Введение

Митохондрии являются автономными органеллами с двойной мембраной, которые имеют собственный геном, представленный кольцевой молекулой ДНК бактериального типа, а также собственный транскриптом и протеом. Наследование митохондриального генома и заболеваний, связанных с мутациями митохондриальной ДНК, происходит по материнской линии [1, 2]. Деление и слияние митохондрий способствует защите митохондриальной ДНК (мтДНК), изменению клеточной энергетике и регуляции деления клеток. Поврежденные или дефектные митохондрии удаляются селективной инкапсуляцией в двойную мембрану аутофагосомы и доставляются в лизосомы для деградации с помощью процесса, называемого митофагией. Митохондрии являются основными генераторами метаболитов и активных форм кислорода (АФК) и эффективными индукторами клеточной гибели (апоптоза) [1]. Митохондрии способны воспринимать «сигналы опасности» инициации воспаления за счет активизации и управления врожденной иммунной системой. Митохондриальная дисфункция может вызывать нарушения во всем организме, приводящие у человека к серьезным последствиям, таким, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, остеоартрит, осложнения при диабете второго типа, онкологические и сердечно-сосудистые заболевания [3].

Митохондрии и рецепторы

Врожденный иммунный ответ зависит от рецепторов опасных эндогенных сигналов (образ-распознающих рецепторов, PRRs). Эти рецепторы являются серией наследуемых рецепторов, которые распознают сохраненные наборы молекулярных мишеней, называемых патоген-ассоциированными молекулярными структурами (PAMPs), и включают Toll-подобные рецепторы (TLRs), RIG-1 (индуцибельный ген ретиновой кислоты) — подобные рецепторы (RLRs), и нуклеотид-олигомеризующие домены (NOD)-подоб-

ные рецепторы (NLRs) [4]. После идентификации PAMPs происходит немедленное выполнение клеточной эффекторных функций без необходимости пролиферации, способствуя быстрой индукции воспалительной реакции. По своей функции PRRs могут быть разделены на три класса: секретлируемые, эндцитозные и сигнальные. Сигнальные PRRs распознают PAMPs и активируют пути передачи сигнала для экспрессии разнообразных генов иммунного ответа, включая провоспалительные рецепторы. PRRs могут также распознать поврежденные ассоциированные молекулярные структуры (DAMPs) [1]. Недавно полученные данные литературы о роли митохондрий в сигналинге RLR, NLR и TLR обсуждаются ниже.

В последнее десятилетие интенсивно исследовались функции и экспрессия в норме и при патологии Toll-подобных рецепторов (TLRs), которые являются одними из наиболее важных представителей семейства сигнальных PRRs [5]. Toll-подобные рецепторы играют ключевую роль при врожденном иммунитете. В зависимости от локализации TLRs, в клетке выделяют рецепторы, расположенные на плазматической мембране (TLR1/2/4/5/6/10) и на мембранах внутриклеточных органелл — эндосоме/эндоплазматическом ретикулеуме (ЭР) (TLR3/7/8/9). Некоторые TLRs (TLR11/12/13) могут экспрессироваться как внутри клетки, так и вне ее. Белки семейства TLRs иницируют врожденный иммунный ответ к PAMP от бактерий, грибов, паразитов и вирусов [4]. Распознавание PAMP белками TLR (TLR3/7/8/9 и, вероятно, TLR4) происходит внутри эндосом и лизосом.

В состоянии покоя неактивированные TLRs находятся на мембране клеток в мономерном состоянии. При связывании с лигандом происходит изменение конформации TIR-домена, который связывается с адапторной молекулой MyD88 (myeloid differentiation protein 88), необходимой для привлечения киназ семейства IRAK (IL-1 receptor associated kinase). После активации IRAK взаимодействует с внутриклеточным фактором TRAF6 (TNF receptor associated factor 6),

в результате чего происходит высвобождение ядерного фактора каппа-В (NF- κ B) и транслокация его в ядро клетки. Ядерный фактор активирует синтез провоспалительных цитокинов, молекул адгезии с последующей активацией структур адаптивного иммунитета. Известен также механизм MyD88-независимой передачи активационных сигналов от TLRs, при котором TIR-домен взаимодействует с адапторной молекулой TRIF (TIR-domain containing adaptor inducing IFN β) с последующей активацией внутриклеточного фактора IRF3 (interferon regulatory factor 3), индуцирующего экспрессию генов интерферонов α и β (IFN α и IFN β), являющихся важнейшими молекулами для дифференцировки Т-лимфоцитов [5].

В настоящее время митохондриям отводится роль контроля передачи сигналов PRR, в частности, передачи сигналов TLR. Нарушение функций проводимости сигналов Toll-подобных рецепторов приводит к целому ряду патологических процессов в организме и воспалению. Наибольшее значение для наблюдающихся сдвигов метаболических процессов имеет развитие инсулинрезистентности, которое особенно выражено в миоцитах, гепатоцитах и жировых клетках. TLR4-стимуляция макрофагов вызывает значительную реконструкцию клеточных липидов [6], и липидные биомаркеры митохондриального происхождения запускают воспалительную реакцию. Определенную роль в воспалении жировой ткани играют также TLR2, хотя их количество и значение уступает TLR4. При ожирении увеличивается число TLR4, TLR2, TLR1, TLR6 в мембранах адипоцитов [7]. Пациенты с ожирением и диабетом 2 типа имеют высокую экспрессию TLR4, и насыщенные свободные жирные кислоты (СЖК) стимулируют через TLR4 излишнее количество провоспалительных цитокинов в жировой ткани, индуцируют дисфункцию β -клеток поджелудочной железы путем активации пути TLR4/MyD88 в островках, впоследствии приводящей к привлечению в них моноцитов/макрофагов и развитию воспаления [8]. Новые данные показывают, что гликопротеин и фетуин А (FetA) выступают в качестве адаптеров между СЖК и TLR4 [9]. Было показано, что регулируемый митохондриями глутамин обеспечивает защиту митохондриальных структур от токсичности кислорода [10]. Глутамин модулирует экспрессию TLR (независимо от MyD88) за счет регулирования экспрессии TRIF (TIR-домен содержащий адаптор, индуцирующий интерферон- β) [11].

Сигнализация TLR также может взаимно контролировать митохондриальную динамику. Стимуляция TLR липополисахаридами (ЛПС) уменьшает экспрессию ряда митохондриальных ферментов, участвующих в цикле Кребса, вызывая метаболическое «переключение» окислительного фосфорилирования к аэробному

гликолизу (эффект Варбурга) [12]. ЛПС существенно увеличивает синтез сукцината, промежуточного продукта в митохондриальном цикле Кребса. Сукцинат действует в качестве эндогенного сигнала опасности для стабилизации гипоксия-индуцибельного фактора 1 α (HIF-1 α), который, в свою очередь, регулирует экспрессию генов IL-1 β и других HIF-1 α зависимых генов. HIF-1 α помогает клетке оптимизировать клеточную продукцию энергии и гомеостаз для выживания и функционирования в среде очага воспаления [13].

В конечном счете, TLR3 вызывает дисфункцию митохондрий, приводящую к апоптозу. Белки SAM и SARM, наиболее консервативные адаптеры TLR, вызывают внутренний апоптоз путем генерации активных форм кислорода (АФК) и деполяризации митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\theta_m$) [14]. Сигналинг TLR2/4 регулирует митохондриальный биогенез через транскрипционные факторы NF- κ B, CREB (cAMP response element-binding protein), NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), и факторов ответа интерферона (IRF-3, IRF-7). AMP-активированная серин/треонин киназа (AMPK) способствует митохондриальному биогенезу и препятствует воспалению, вмешиваясь в экспрессию NF- κ B-зависимого цитокина. Сиртуин 1 (SIRT1), регулятор митохондриального энергетического гомеостаза, является противовоспалительным, и ядерный рецептор-связывающий белок 1 (RIP140), который подавляет митохондриальный биогенез, коактивирует определенные гены цитокинов [15]. Неудивительно, что к настоящему моменту митохондрии рассматриваются как структуры, играющие важную роль во многих заболеваниях, связанных с TLR.

Двухцепочечная РНК (дцРНК) вируса, прежде всего, детектируется генами RIG-I, RLR и геном, ассоциированным с дифференцировкой меланомы (MDA-5). Геликаза RIG-1 участвует в распознавании относительно коротких дцРНК, 3'-ОН- и 5'-ОН-монофосфатов дцРНК; фрагментов РНК, образующихся в результате противовирусного действия активированной РНКазы L; регионов, обогащенных поли-U/UC (uridine-rich poly), генома вирусного гепатита С; одноцепочечных РНК (оцРНК), характеризующихся наличием трифосфатных группировок в их 5-конце. Продукт гена MDA-5 распознает относительно длинные дцРНК [16]. RIG-I, RLR, MDA-5 активируют ядерный фактор В (NF- κ B) и интерферон-регулирующий фактор 3 (IRF-3), в результате чего синтезируются интерферон I типа (IFN) и другие провоспалительные цитокины, которые способствуют адаптивному противовирусному иммунитету [17].

Митохондрии образуют митоксому для сигнализации RLR и вовлечения в патогенез многочисленных связанных с RLR воспалительных заболеваний. Ми-

токсома состоит из кодируемого ядерным геномом белка внешней митохондриальной мембраны, называемого митохондриальным противовирусным сигнальным белком (MAVS) или стимулятором промотора 1 IFN β (IPS1), CARD адаптера индукции IFN β (CARDIF) или вирус-индуцированного адаптера сигнализации (VISA) [18]. На митохондриальной мембране MAVS находится в непосредственной связи с митофузином 1. Дефицит экспрессии MAVS сопровождается низким противовирусным ответом. MAVS взаимодействует с RIG-I и приводит к индукции противовирусной и воспалительной реакции, опосредованной взаимодействием с TRAF (рецептор-ассоциированный фактор TNF). MAVS также координирует апоптотические и метаболические функции, связываясь с пероксисомами, эндоплазматическим ретикуломом (ER) и аутофагосомами [19]. Проапоптотическое действие адаптерной молекулы MAVS обусловлено изменением митохондриального мембранного потенциала и активизацией каспаз.

Сигналинг RLR зависит от состояния неповрежденной митохондрии и функционального удлинения митохондриальной сети. Клетки с рассредоточенным мембранным потенциалом ($\Delta\Psi_m$) в митохондриях являются дефицитными по опосредованной MAVS противовирусной сигнализации [19], и способствуют связыванию MAVS со стимулятором гена интерферона (STING), белком эндоплазматического ретикулума, вовлеченного в пути RLR [20]. Слияние митохондрий контролируется митофузином (MFN1, MFN2) и продуктом гена оптической атрофии (OPA1), а деление контролируется динамин подобным белком 1 (Dcp1) и белком деления митохондрий 1 (FIS-1) [17]. Нокадаун MFN1 или OPA1 уменьшает вирус-индуцированную активацию транскрипционных факторов, NF- κ B и IRF-3, в то время как нокадаун Dcp1 или FIS-1 увеличивает сигналинг RLR [21]. Интересно, что MFN2 может также выступать в качестве ингибитора противовирусного сигналинга [17]. Недавно было обнаружено, что другой белок слияния/деления митохондрий, E3 убиквитин протеин лигаза 1 (MUL1) может непосредственно взаимодействовать с MAVS и модулировать ответ RLR [22]. Объединенные данные показывают, что нарушение деления или слияния, приводящее к фрагментации митохондрий, снижает сигналинг RLR.

Процесс удаления фрагментированных митохондрий при митофагии также регулирует сигналинг RLR. Гены ATG5 и ATG12, связанные с митофагией, подавляют сигналинг RLR [23]. Регулятор митофагии, SMAD-специфическая E3 убиквитин протеин лигаза 1 (SMURF1), участвует в ингибировании MAVS [24]. Дополнительные митохондриальные белки также участвуют в модулировании сигнальных путей

RLR, в том числе разобщающий белок 2 (UCP2), связанная с иммунитетом ГТФаза семейства M (IRGM), металлопротеиназа-2 матрикса (MMP-2), транслоказа внешней митохондриальной мембраны 70 (TOM70), Nod-подобный рецептор X1 (NLRX1), рецептор главной глобулярной области компонента комплемента (C1q gC1qR) [25].

Семейство цитозольных NLR (NLRP1, NLRP3 и NLRC4) выступают в качестве основных компонентов мультибелкового комплекса инфламмасом [26], которые образуются в ответ на ряд различных физических и химических импульсов. Это, в свою очередь, способствует активации каспазы-1, приводящей к созреванию и секреции IL-1 β , IL-18 и IL-33. На сегодняшний день известно о 22 рецепторах семейства NLRs у человека. NLRs-белки имеют C-концевую область, распознающую консервативные микробные паттерны или другие лиганды, нуклеотид-связывающий NACHT-домен, N-концевой эффекторный CARD (caspase-recruitment domain) или пириновый (PYD) домены, отвечающие за взаимодействие с адаптерными молекулами и обеспечивающие передачу сигнала.

NLRP3 — это наиболее изученный мультибелковый комплекс, необходимый для синтеза биологически активного IL-1 β в ответ на различные цитозольные «сигналы опасности». Механизм активации NLRP3-инфламмосомы охарактеризован не в полной мере. Доказательств прямого связывания лиганда с инфламмосомой до сих пор нет, что ставит под сомнение концепцию о том, что это рецептор [27]. Накопленные к настоящему времени данные позволяют предположить, что активация NLRP3 зависит от эффективной локализации NLRP3 в митохондрии [28, 29] и от механизма деубиквитинирования, инициированного сигналингом TLR и митохондриальными АФК [30]. Как и в случае сигналинга RLR, функции NLRP3, по-видимому, связаны с сетью жизнеобеспечения митохондрий, особенно при их активации. В состоянии покоя NLRP3 белок связан с ЭР, но при активации перемещается на митохондрии и ассоциированную с митохондриями мембрану ЭР [31]. Опосредованный ацетилованным α -тубулином динеин-зависимый транспорт митохондрией является ключевым для взаимодействия NLRP3 на ЭР с ASC (апоптоз-ассоциированный регуляторный белок, содержащий CARD-домен) на митохондриях [29]. Кроме того, белок RLR сигналинга MAVS служит связующим звеном для привлечения NLRP3 в митохондрии, способствуя выработке IL-1 β [28]. Активация инфламмосом NLRP3 ослабляется в макрофагах с истощенной мтДНК, в клетках, дефицитных по окислительному фосфорилированию, обработанных митохондриальными антиоксидантами, а также в макрофагах, где удален митохондриальный потенциал-зависимый анионный канал [31].

Предотвращение удаления митохондрий путем митофагии, благодаря нарушению аутофагии или через удаление генов митофагии, в частности гена PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) или гена E3 убиквитин лигазы (ген Паркин), приводит к увеличению активации инфламмасом NLRP3, продукции митохондриальных АФК, и повышению секреции IL-1b [26, 31]. NLRX1 (также известный как NOD5) является единственным представителем NLR семейства, который локализуется в митохондриальном матриксе, где взаимодействует с митохондриальным матриксным протеином UQCRC2 (субъединица 2 комплекса цитохром b-c1) комплекса III цепи переноса электронов, и с митохондриальным фактором элонгации Tu (TUFM), посредником вирус-индуцированной аутофагии, оба из которых могут регулировать MAVS [6, 32]. Протеин NLRX1 ингибирует RLR-ассоциированное внутриклеточное возбуждение механизмов продукции IFN- β , непосредственно взаимодействуя с NACHT доменом с адаптерным протеином MAVS.

Митохондриальная дисфункция связана с рядом заболеваний, ассоциированных с NLR, и существуют доказательства метаболического контроля сигналинга NLR [33]. Инфламмосомы играют фундаментальную роль в развитии аутовоспалительных заболеваний, таких как семейный холодовой аутовоспалительный синдром, синдром Макла-Уэльса, и дополнительную роль в развитии инфекционных и иммунных патологий и распознавании тканевого повреждения [27]. Однако остается необходимым определить, действительно ли эти процессы напрямую опосредованы митохондриями; действительно ли насыщенные ЖК непосредственно контролируют инфламмосомы NLRP3 с помощью TLR4, связывая таким образом сигналинг NLR с резистентностью к инсулину [33].

Механизмы участия митохондрий в воспалении

Митохондрии содержат широкий спектр молекул, которые после их освобождения из пространства двойной мембраны ведут себя как митохондриальные «образы опасности», ассоциированные с повреждением (Damage-associated molecular patterns, DAMPs, mtDAMPs), активирующие воспалительные реакции. Предположительно, активация клеток иммунной системы с помощью митохондриальных «образов опасности» вызывается:

- 1) митохондриальными белками, несущими на N-концах формилметионин, что типично для бактериальных белков;
- 2) митохондриальным кардиолипином;
- 3) АТФ;
- 4) митохондриальной ДНК (мтДНК);
- 5) активные формы кислорода (mROS, АФК) [34].

Митохондриальная ДНК, которая высвобождается из поврежденных митохондрий, способствует активации инфламмасом макрофагов [26]. Нарушение удаления поврежденных митохондрий приводит к получению большего количества мтДНК и увеличению активации инфламмасом [26, 30]. Возможно несколько вариантов действия мтДНК как активатора иммунного ответа. Азотистые основания мтДНК могут быть *in vivo* окислены. Окисленная мтДНК, попадающая в цитоплазму, непосредственно активирует NLRP3 инфламмосомы и связана с активацией апоптоза [35]. Для активации нейтрофилов могут требоваться дополнительные факторы. Митохондриальная ДНК находится в клетке в ассоциации с хеликазой TWINKLE и митохондриальным фактором транскрипции (TFAM). TFAM в комбинации с формилированными митохондриальными белками усиливает активирующее действие комплексов на моноциты человека. Мишенью для мтДНК могут выступать и другие клетки иммунной системы (моноциты, макрофаги). Недавно было обнаружено, что высокоочищенные препараты мтДНК оказались не способны вызывать активацию нейтрофилов человека, что может указывать на существование дополнительных факторов, обеспечивающих узнавание мтДНК как «образа опасности» [34].

Предположительно, АФК являются решающими митохондриальными «образами опасности», ассоциированными с повреждением, для активации инфламмосом. Метаболические изменения в поставке субстрата в митохондрии и возможные дальнейшие посттрансляционные модификации митохондриальных белков могут действовать как модуляторы продукции АФК. Митохондриальная ЭТЦ является основным генератором АФК, связанных с инфламмосомой. В митохондриях происходит одно- и даже двухэлектронное восстановление кислорода с образованием супероксида и H₂O₂ соответственно. Установлено, что супероксид-анион образуется в результате одноэлектронного восстановления кислорода в митохондриях в комплексах I, II, и III ЭТЦ [36]. Супероксид-анион (O₂⁻) матрикса может привести к повреждению мтДНК и белков, в том числе самих же комплексов ЭТЦ с высоким содержанием железа и серы. Кроме того, митохондриальными источниками супероксида могут быть моноаминоксидаза и цитохром-b5-редуктаза, глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (GPDH) и цитохромы P450, аконитаза, пируватдегидрогеназа, α -кетоглутаратдегидрогеназа (ферменты матрикса) [37]. Убихинон-оксидоредуктаза способна высвобождать АФК в матрикс во время β -окисления жирных кислот. Вклад перечисленных выше факторов в генерацию митохондриальных АФК *in vivo* не является выясненным до конца, но может быть значительным [36].

В ряде исследований было обнаружено наличие запрограммированного механизма генерации АФК на внешней митохондриальной мембране. Супероксид может «контролировать» собственную продукцию благодаря активизации разобщающих белков (UCP), которые позволяют протонам перетекать обратно через внутреннюю мембрану и сокращать продукцию супероксида в ЭТЦ. Удаление гена разобщающего белка 2 (UCP2) увеличивает продукцию митохондриальных АФК, провоспалительную продукцию цитокинов, антибактериальную активность, что позволяет обратить внимание на возможную терапевтическую пользу таргетного действия на UCP2 для повышения иммунитета. TRAF6-убиквитинирование ECSIT (эволюционно консервативный интермедиат в Toll сигнальных путях) в митохондриях способствует сборке комплекса I ЭТЦ и повышает производство АФК. ECSIT-дефицитные или TRAF6-дефицитные макрофаги продуцируют меньше АФК при стимуляции TLR и обладают сниженной способностью уничтожать сальмонеллы [36]. Митохондриальные АФК по-разному регулируют врожденный иммунный ответ на ДНК-содержащие и РНК-содержащие вирусы [38]. Также они могут играть различную роль в остром и хроническом воспалении при субклинических дозах ЛПС, которые вызывают TLR-опосредованную генерацию АФК и позволяют легко индуцировать провоспалительные медиаторы [39].

Митохондрии являются ключевыми регуляторами сигналинга ионов Ca^{2+} , при этом ионы Ca^{2+} стимулируют митохондриальный биогенез. Повышение Ca^{2+} приводит к активации ряда АФК-образующих ферментов, включая стимуляцию образования АФК в дыхательной цепи митохондрий. Ca^{2+} -зависимое образование АФК в дыхательной цепи ответственно за высокую проницаемость внутренней митохондриальной мембраны. Открывая митохондриальную пору, АФК и Ca^{2+} вызывают набухание митохондрий, повреждение их наружной мембраны и выход из межмембранного пространства в цитоплазму белков межмембранного пространства: цитохрома С, прокаспазы-2,3,9, апоптоз-индуцирующего фактора (AIF). Флавопротеин AIF и эндонуклеаза G переходят в ядро, где активируют нуклеазы, разрушающие ДНК. Клетка фрагментируется с образованием апоптических телец [15].

Свободные радикалы и АФК играют фундаментальную роль в механизме развития многих заболеваний человека, в том числе: болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, воспалительные явления (как следствие избыточного образования супероксидного аниона), реперфузионное поражение тканей мозга и миокарда.

Митохондрии эндотелия выполняют важные регуляторные и сигнальные функции с участием АФК. При высоких концентрациях глюкозы (гипергликемия) и при одновременной стимуляции эндотелиальных клеток гистамином наблюдается повышение уровня ионов Ca^{2+} в митохондриях. Роль митохондриального кальция в повреждении ЭК при реперфузии, как и в целом, взаимосвязь кальция и АФК в клетках эндотелия представляют собой важную, но малоизученную проблему. Имеющиеся на данный момент данные позволяют предположить, что при реоксигинации возникают осцилляции цитозольного кальция, которые влияют на состояние митохондрий, усиливая генерацию АФК и экзоцитоз адгезионных молекул, вследствие чего усугубляется дисфункция эндотелия за счет инфильтрации лейкоцитов. АФК митохондриального происхождения играют важную роль в сокращении сосудов малого круга в условиях гипоксии. H_2O_2 может имитировать действие гипоксии в условиях нормоксии в эндотелиальных клетках легочной артерии [37].

Заключение

Подробное выяснение роли недавно обнаруженных рецепторов иммунного сигналинга (TLR, RLR, NLR), связанных с функциями митохондрий, и оценка того, как продукты деятельности митохондрий влияют на иммунные клетки, имеет первостепенное значение. «Контроль качества» целостности и функции митохондрий важен в патогенезе основных стадий иммунных заболеваний. В процессе воспаления клетке необходима эффективная работа митохондрий и обеспечение жесткого контроля митохондриальной динамики и биогенеза. При хронических заболеваниях, сопровождающихся митохондриальной дисфункцией и воспалением, важно понимать связь между воспалением, биогенезом митохондрий и обменом веществ. Агенты, которые усиливают митофагию, модулируют внутриклеточный сигналинг Ca^{2+} и улучшают слияние митохондрий и «контроль качества» митохондрий (путем удаления АФК и цитозольной мтДНК), могут инициировать положительный противовоспалительный эффект и имеют потенциал для ослабления течения широкого спектра воспалительных заболеваний. Некоторые из этих подходов, в том числе использование антиоксидантов (металлопорфирины) [40], специфической терапии, вызывающей митофагию (рапамицин), использование ингибиторов митохондриального деления (MDIVI), манипуляции с АФК (за счет белков UCP) и фармакологические манипуляции с митохондриальными сиртуинами могут иметь сходный эффект с применением противовоспалительных препаратов, например ингибиторов

интерлейкина 1β или инфламината [41]. Авторегуляция, направленная на предотвращение избыточной активации иммунных реакций и защиту здоровых тканей от иммуно-опосредованного повреждения при опухолевых заболеваниях, может осуществляться через галектин-3, который приводит к увеличению количества лимфоцитов со сниженным митохондриальным потенциалом в 2-5 раз [42]. До настоящего времени большинство данных литературы было ограничено исследованиями *in vitro*. Эти исследования должны быть перенесены на *in vivo* модели или на заболевания человека, чтобы полностью подтвердить роль митохондриальной дисфункции в развитии воспалительных патологий.

References

- Ivanova M.M., Borodachev E.N., Sazonova M.A. Human pathologies associated with mutations of mitochondrial genome. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2012; (3): 115-22. (in Russian)
- Lebkova N.P., Klembovsky A.I. On evolutionary problems of mitochondrial pathology. *Patogenez.* 2008; 6 (4): 24-30. (in Russian)
- Chistiakov D.A., Sobenin I.A., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial DNA mutations in atherosclerotic complications in diabetes. *World J Cardiol.* 2012; 4(5): 148-56.
- Sukoyan G.V. Signalosome as therapeutic targets. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2012; (4): 15-19. (in Russian)
- Katunina O.R. Functions of Toll-like receptors as an inborn immunity component and their participation in the pathogenesis of dermatoses of different etiologies. *Vestn. dermatol. venerol.* 2011; (2): 18-25. (in Russian)
- Allen I.C., Moore C.B., Schneider M., Lei Y., Davis B.K., Scull M.A. et al. NLRX1 protein attenuates inflammatory responses to infection by interfering with the RIG-I-MAVS and TRAF6-NF- κ B signaling pathways. *Immunity.* 2011; 34(6): 854-65.
- Schwarz V.Ya. Infection as an obesity pathogenesis factor. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2014; (2): 94-100. (in Russian)
- Kzhyshkowska Yu.G., Gratchev A.N. Monocyte and macrophage markers for diagnostics of immunopathologies. *Pathogenez.* 2012; Vol. 10 (1): 14-19. (in Russian)
- Trepanowski J.F., Mey J., Varady K.A. Fetuin-A: a novel link between obesity and related complications. *Int J Obes (Lond).* 2014; 39(5): 734-41.
- Hu Y.M., Yeh C.L., Pai M.H., Lee W.Y., Yeh S.L. Glutamine administration modulates lung $\gamma\delta$ T lymphocyte expression in mice with polymicrobial sepsis. *Shock.* 2014; 41(2): 115-22.
- Perez-Barcelona J., Marse P., Zabalegui-Perez A., Corral E., Herran-Monge R., Gero-Escapa M. et al. A randomized trial of intravenous glutamine supplementation in trauma ICU patients. *Intensive Care Med.* 2014; 40(4): 539-47.
- Garedew A., Henderson S.O., Moncada S. Activated macrophages utilize glycolytic ATP to maintain mitochondrial membrane potential and prevent apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 2012. doi: 10.1038/cdd.2012.103.
- Malyshev I.Yu., Kruglov S.V., Lyamina S.V. Hypoxia, inflammation and phenotypic flexibility of macrophages: the central role of HIF-1 and NF κ B. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2012; (3): 42-50. (in Russian)
- Sethurathinam S., Singh L.P., Panneerselvam P., Byrne B., Ding J.L. UXT plays dual opposing roles on SARM-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 2013; 587(20): 3296-302.
- Piantadosi C.A., Suliman H.B. Redox regulation of mitochondrial biogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2012; 53(11): 2043-53.
- Abaturov A.E., Volosovets A.P., Yulish E.I. Role of RIG-like receptors in recognition of pathogen-associated molecular patterns of infectious pathogenic agents and in inflammation development. Part 2. RLR ligands and intracellular signaling pathways associated with RLR. *Zdorov'e rebenka.* 2013; 7(50): 188-94. (in Russian)
- Koshiba T. [Mitochondria and antiviral immunity]. *Seikagaku.* 2013; 85(5): 336-44.
- West A.P., Khoury-Hanold W., Staron M., Tal M.C., Pineda C.M., Lang S.M. et al. Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature.* 2015; 520(7548): 553-57.
- Ichinohe T., Yamazaki T., Koshiba T., Yanagi Y. Mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110(44): 17963-68.
- Ishikawa H., Barber G.N. The STING pathway and regulation of innate immune signaling in response to DNA pathogens. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(7): 1157-65.
- Castanier C., Zemirli N., Portier A., Garcin D., Bidire N., Vazquez A., Arnoult D. MAVS ubiquitination by the E3 ligase TRIM25 and degradation by the proteasome is involved in type I interferon production after activation of the antiviral RIG-I-like receptors. *BMC Biol.* 2012; 10: 44. doi: 10.1186/1741-7007-10-44.
- Ye J.S., Kim N., Lee K.J., Nam Y.R., Lee U., Joo C.H. Lysine 63-linked TANK-binding kinase 1 ubiquitination by mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 2 is mediated by the mitochondrial antiviral signaling protein. *J Virol.* 2014; 88(21): 12765-76.
- Lei Y., Wen H., Yu Y., Taxman D.J., Zhang L., Widman D.G. et al. The mitochondrial proteins NLRX1 and TUFM form a complex that regulates type I interferon and autophagy. *Immunity.* 2012; 36(6): 933-46.
- Kathania M., Zeng M., Yadav V.N., Moghaddam SJ, Yang B, Venuprasad K. Ndfip1 regulates itch ligase activity and airway inflammation via Ubch7. *J Immunol.* 2015; 194(5): 2160-67.
- Jacobs J.L., Coyne C.B. Mechanisms of MAVS regulation at the mitochondrial membrane. *J Mol Biol.* 2013; 425(24): 5009-19.
- Jung S.S., Moon J.S., Xu J, Ifedigbo E, Ryter S.W., Choi A.M. et al. Carbon monoxide negatively regulates NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015; 308(10): 1058-67.
- Manukyan G.P. Autoinflammation and NLRP3 inflammasome. *Uspekhi sovremennoi biologii.* 2015; Vol. 135(1): 64-73. (in Russian)
- Allam R., Lawlor K.E., Yu E.C., Mildenhall A.L., Moujalled D.M. et al. Mitochondrial apoptosis is dispensable for NLRP3 inflammasome activation but non-apoptotic caspase-8 is required for inflammasome priming. *EMBO.* 2014; 15(9): 982-90.
- Misawa T., Saitoh T., Kozaki T., Park S, Takahama M, Akira S. Resveratrol inhibits the acetylated α -tubulin-mediated assembly of NLRP3-inflammasome. *Int Immunol.* 2015; 27(9): 425-34.

30. Park S., Juliana C., Hong S., Datta P., Hwang I., Fernandes-Alnemri T. et al. The mitochondrial antiviral protein MAVS associates with NLRP3 and regulates its inflammasome activity. *J Immunol.* 2013; 191(8): 4358-66.

31. Menu P., Mayor A., Zhou R., Tardivel A., Ichijo H., Mori K. et al. ER stress activates the NLRP3 inflammasome via an UPR-independent pathway. *Cell Death Dis.* 2012; 3: e261. doi: 10.1038/cddis.2011.132.

32. Lei Y., Wen H., Ting J.P. The NLR protein, NLRX1, and its partner, TUFM, reduce type I interferon, and enhance autophagy. *Autophagy.* 2013; 9(3): 432-33.

33. Finucane O.M., Lyons C.L., Murphy A.M., Reynolds C.M., Klinger R., Healy N.P. et al. Monounsaturated fatty acid-enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion and insulin resistance despite obesity. *Diabetes.* 2015; 64(6): 2116-28.

34. Prikhodko A.S., Shabanov A.K., Zinovkina L.A., Popova E.N., Aznauryan M.A., Lanina N.O., et al. Pure mitochondrial DNA does not activate human neutrophils in vitro. *Biokhimiya.* 2015; 80(5): 746-53. (in Russian)

35. van der Burgh R., Nijhuis L., Pervolaraki K., Compeer E.B., Jongeneel L.H., van Gijn M. et al. Defects in mitochondrial clearance predispose human monocytes to interleukin-1 β hypersecretion. *J Biol Chem.* 2014; 289(8): 5000-12.

36. Bulua A.C., Simon A., Maddipati R., Pelletier M., Park H., Kim K.Y., et al. Mitochondrial reactive oxygen spe-

cies promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Exp Med.* 2011; 208(3): 519-33.

37. Nadeev A.D., Goncharov N.V. Reactive oxygen species in cells of cardiovascular system. *Kompleksnye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy.* 2014; (4): 80-94. (in Russian)

38. Gonzalez-Dosal R., Horan K.A., Paludan S.R. Mitochondria-derived reactive oxygen species negatively regulates immune innate signaling pathways triggered by a DNA virus, but not by an RNA virus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 418(4): 806-10.

39. Deng H., Maitra U., Morris M., Li L. Molecular mechanism responsible for the priming of macrophage activation. *J Biol Chem.* 2013; 288(6): 3897-906.

40. Lyshko A.I., Dudchenko A.M. Catalytic antioxidants are potential therapeutic agents for correction of oxidative stress-mediated pathologies. *Pathogenez.* 2013; 11(2): 19-24

41. Temchenko A.V., Nikiforov N.G., Orekhova V.A., Melnichenko A.A., Karagodin V.H., Sobenin I.A. et al. Achievements in therapy of atherosclerosis. *Pathogenez.* 2013; 11(2): 11-18.

42. Vasil'eva O.A., Isaeva A.V., Ryazantseva N.V. Effect of galectin-3 in apoptosis activated in vitro CD4+ lymphocytes. *Vestnik nauki Sibiri.* 2015; (15): 347-51. (in Russian)

Сведения об авторах:

Желанкин Андрей Викторович, канд. биол. наук, науч. сотр. отдела сердечно-сосудистой патологии НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова, e-mail: zhelankin.andrey@gmail.com

Карагодин Василий Петрович, доктор биол. наук, проф., e-mail: vpk@mail.ru

Орехов Александр Николаевич, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. ангиопатологии НИИОПП РАН; директор НИИ атеросклероза, Инновационный центр Сколково, e-mail: a.h.orехob@gmail.ru

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616.24+616.379-008.64

Кожевникова С.А., Будневский А.В., Овсянников Е.С., Малыш Е.Ю., Белов В.Н.

Хроническая обструктивная болезнь легких и сахарный диабет: взгляд на эпидемиологию, патогенетические механизмы, лечение

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 10

В последнее время все чаще изучается негативное влияние сахарного диабета (СД) 2 типа на хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ). По данным литературы, СД чаще диагностируется у пациентов с ХОБЛ по сравнению с общей популяцией: среди пациентов с ХОБЛ СД 2 типа встречается в 18,7% случаев, по сравнению с пациентами без ХОБЛ — 10,5%. Сложность этой ассоциации заключается, прежде всего, в том, что ХОБЛ рассматривается как фактор риска развития СД 2 типа. Результаты ряда исследований показывают наличие тесной связи между гликемическим статусом и спирометрическими показателями — объемом форсированного выдоха за 1 секунду, форсированной жизненной емкостью легких. Обструктивные, рестриктивные, смешанные вентиляционные нарушения функции легких отмечаются при состояниях, предшествующих началу СД 2 типа, таких, как нарушение толерантности к глюкозе и/или у больных с метаболическим синдромом. Ассоциация между функцией легких и СД 2 типа объясняется биохимическими изменениями в дыхательных путях, в ткани легких. У пациентов с СД 2 типа снижение функции легких рассматривается как следствие самого СД 2 типа и как риск развития и прогрессирования ХОБЛ. Связь между двумя сложными нозологиями — ХОБЛ и СД 2 типа подтверждается эпидемиологически, общими патогенетическими механизмами — хроническое системное воспаление, оксидативный стресс, гипоксия, хроническая гипергликемия, побочными эффектами медикаментозных препаратов, используемых в лечении двух нозологий — ингаляционные и / или системные глюкокортикостероиды, ингаляционные бронходилататоры, пероральные сахароснижающие лекарственные средства. Однако, патогенетические механизмы, лежащие в основе высокой распространенности СД 2 типа при ХОБЛ, все еще остаются неясным и требуют детального изучения. Изучение механизмов ассоциации ХОБЛ и СД с целью разработки методов их коррекции, профилактики и подбора адекватных комбинированных схем лечения пациентов с данной коморбидной патологией является чрезвычайно актуальной проблемой.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких; сахарный диабет 2 типа; патогенетические механизмы.

Для цитирования: Кожевникова С.А., Будневский А.В., Овсянников Е.С., Малыш Е.Ю., Белов В.Н. Хроническая обструктивная болезнь легких и сахарный диабет: взгляд на эпидемиологию, патогенетические механизмы, лечение. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 122–127.

Для корреспонденции: Кожевникова Светлана Алексеевна, канд. мед. наук, ассистент каф. общей врачебной практики (семейной медицины) ИДПО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко, e-mail: kozhevnikova_s_a@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.06.16

Kozhevnikova S.A., Budnevskiy A.V., Ovsyannikov E.S., Malyshev E.Yu., Belov V.N.

Chronic obstructive pulmonary disease and diabetes: a look at the epidemiology, pathogenetic mechanisms, treatment

The State Budgetary Institution of Higher Professional Education «Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko» of the Ministry of Public Health of the Russian Federation; 10, Studencheskaya Street, Voronezh, 394036, Russian Federation

Lately, increasingly studied the negative impact of diabetes type 2 on chronic obstructive pulmonary disease (COPD). According to literary data diabetes type 2 is more often diagnosed in patients with COPD in comparison with the general population: diabetes type 2 occur among patients with COPD in 18.7%, in comparison with patients without COPD — in 10.5%. The complexity of this association is primarily that chronic obstructive lung disease is regarded as a risk factor for diabetes type 2. The results of some researches show existence of close connection between the glycemic status and spirometric indicators — forced expiratory volume 1-second, forced vital capacity. Obstructive, restrictive, mixed ventilatory lung dysfunction observed in the states prior to the beginning of diabetes, such as impaired glucose tolerance and / or in patients with

metabolic syndrome. The associations between lungs function and diabetes type 2 is explained by biochemical changes in airways, in lungs tissue. In patients with diabetes type 2 the decrease of lungs function is considered as a result of diabetes type 2 and as risk of development and progressing of COPD. Communication between the two complex nosologies — COPD and diabetes type 2 is confirmed by epidemiological data, common pathogenetic mechanisms — chronic systemic inflammation, oxidative stress, hypoxia, chronic hyperglycemia, side effects of drugs used in the treatment of two diseases — inhaled and / or systemic corticosteroids, inhaled bronchodilators, oral hypoglycemic agents. However, the pathogenetic mechanisms underlying the high prevalence of diabetes type 2 in patients with COPD is still unclear and requires a detailed study. Thus, it is actually and reasonable to conduct scientific and clinical work on identifying and better understanding of the exact mechanisms of the association between COPD and diabetes type 2 to develop methods for their correction, prevention and selection of adequate combination regimens in patients with these comorbid pathologies.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease; diabetes type 2; pathogenetic mechanisms.

For citation: Kozhevnikova S.A., Budnevskiy A.V., Ovsyannikov E.S., Malysh E.Yu., Belov V.N. Chronic obstructive pulmonary disease and diabetes: a look at the epidemiology, pathogenetic mechanisms, treatment. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (4): 122–127. (in Russ).

For correspondence: Svetlana A. Kozhevnikova — Candidate of Medicine, assistant of chair of general medical practice Higher Degree Institute The State Budgetary Institution of Higher Professional Education «Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko» of the Ministry of Public Health of the Russian Federation; e-mail: kozhevnikova_s_a@mail.ru.

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Kozhevnikova S.A., <http://orcid.org/0000-0001-9497-2916>

Budnevskiy A.V., <http://orcid.org/0000-0002-1171-2746>

Ovsyannikov E.S., <http://orcid.org/0000-0002-8545-6255>

Malysh E.Yu., <http://orcid.org/0000-0003-3723-6466>

Belov V.N. <http://orcid.org/0000-0002-5096-193X>

Received 16.06.16

Введение

Сахарный диабет (СД) 2 типа — хроническое неинфекционное заболевание, распространенность которого в мире непрерывно растет. По прогнозам Международной диабетической федерации, к 2030 г. ожидается увеличение числа больных СД 2 типа до 552 млн [1]. В настоящее время все чаще демонстрируется негативное влияние СД 2 типа на течение хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Результаты ряда проспективных долгосрочных исследований показали наличие тесной связи между гликемическим статусом и спирометрическими показателями — объемом форсированного выдоха за 1 с (ОФВ₁), форсированной жизненной емкостью легких (ФЖЕЛ). При оценке показателей спирометрии у больных ХОБЛ и СД 2 типа было отмечено снижение значений ОФВ₁ в среднем на 71 мл в год, что может говорить о длительном негативном воздействии гипергликемии на функцию легких. Ассоциация между функцией легких и СД 2 типа объясняется биохимическими изменениями в дыхательных путях, в ткани легких. У пациентов с СД 2 типа снижение функции легких рассматривается как следствие самого СД 2 типа и как риск развития и прогрессирования ХОБЛ [2].

Эпидемиология

СД чаще диагностируется у пациентов с ХОБЛ по сравнению с общей популяцией: среди пациентов с ХОБЛ СД 2 типа встречается в 18,7% случаев, по сравнению с пациентами без ХОБЛ — 10,5% [3].

Показано, что больные ХОБЛ подвержены высокому риску развития СД 2 типа: у 20,0% пациентов с ХОБЛ выявляются нарушения углеводного обмена, различные сердечно-сосудистые заболевания — артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца. Вероятно, ХОБЛ можно рассматривать как один из факторов риска развития СД 2 типа, заболеваний сердечно-сосудистой системы [4].

Риск развития СД 2 типа связан со значительным снижением легочной функции. Наблюдается обратная корреляционная связь ФЖЕЛ, ОФВ₁ с выраженностью инсулинорезистентности (ИР) [5]. По данным G. Engstrom и соавт., риск развития СД 2 типа обратно пропорционален изменениям параметров спирометрии: через 13 лет наблюдения у пациентов с ЖЕЛ <4,06 л частота развития СД составила 7,0%, а у пациентов с ЖЕЛ >4,75 л — 1,0%. Также ЖЕЛ обратно коррелировала с уровнем глюкозы крови: через 13 лет наблюдения у пациентов с ЖЕЛ <4,06 л уровень глюкозы крови составил

$5,19 \pm 0,99$ ммоль/л, а у пациентов с ЖЕЛ $>4,75$ л — $4,98 \pm 0,58$ ммоль/л [6].

Y. Song и соавт. доказали, что ХОБЛ — независимый фактор риска развития СД 2 типа. В течение 12 лет наблюдения больных ХОБЛ выявлено, что относительный риск развития СД 2 типа составил 1,38 и не зависел от факта курения, возраста, уровня физической активности, индекса массы тела, потребления алкоголя, проводимой терапии [7]. J.R. Feary и соавт. продемонстрировали, что у курящих пациентов с СД 2 типа в возрасте до 45 лет риск развития ХОБЛ значительно выше по сравнению с некурящими пациентами с СД 2 типа. В группе больных СД 2 типа в возрасте старше 45 лет риск развития ХОБЛ не зависел от статуса курения [8].

Подчеркивается большая предрасположенность к развитию СД 2 типа у пациентов с бронхитическим фенотипом ХОБЛ — 10,6% случаев по сравнению с пациентами с эмфизематозным фенотипом ХОБЛ — 8,2%, учитывались при этом ожирение, курение, степень обструкции дыхательных путей, степень тяжести ХОБЛ, возраст, пол [9].

Патогенетические механизмы

Патогенетические механизмы, лежащие в основе высокой распространенности СД 2 типа при ХОБЛ, все еще остаются неясными и требуют детального и глубокого изучения. Среди потенциальных механизмов ассоциации ХОБЛ и СД 2 типа рассматриваются хроническое системное воспаление, оксидативный стресс, хроническая гипергликемия [3].

Хроническое системное воспаление, характерное для ХОБЛ и СД 2 типа, потенцирует развитие ИР, атеросклероза, многих других системных проявлений ХОБЛ [10].

В исследовании ECLIPSE показано, что хроническое системное воспаление напрямую связано с частотой обострений ХОБЛ и уровнем смертности. Главным образом данный факт зависит от сопутствующих ХОБЛ заболеваний сердечно-сосудистой системы и нарушений обмена веществ, обусловленных хроническим системным воспалением и усугубляющих взаимосвязь между ХОБЛ и СД [3,11].

У пациентов с ХОБЛ повышены уровни провоспалительных цитокинов, таких, как фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), интерлейкин-6 (ИЛ-6), С-реактивный белок (СРБ).

ФНО- α как маркер системного воспаления в высоких концентрациях выявляется при ХОБЛ тяжелой и очень тяжелой степени тяжести. Высокий уровень ФНО- α , влияя на метаболизм глюкозы и ИР, является также фактором риска развития СД 2 типа [12].

J.A. Wedzicha и соавт. показали статистически значимую связь повышенного уровня ИЛ-6 с развитием обострения ХОБЛ по сравнению с пациентами с ХОБЛ вне обострения. Считается, что ИЛ-6 является мощным стимулятором выработки СРБ. Повышенный уровень СРБ также выявляется при обострении ХОБЛ вне зависимости от степени нарушения бронхиальной проходимости и стадии заболевания [13].

Однако более детальный анализ исследований последних лет показал, что сведения о зависимости уровня СРБ и выраженности ХОБЛ весьма противоречивы. Так, по результатам исследования W.Q. Gan и соавт., у пациентов с обострением ХОБЛ и с ХОБЛ вне обострения уровень СРБ значительно выше по сравнению с больными без ХОБЛ [14]. По данным L.G. Franciosi и соавт., связь между уровнем СРБ и ХОБЛ статистически не значима [15]. F. Garcia-Rio и соавт. выявили у больных ХОБЛ стабильного течения статистически значимо повышенные уровни СРБ и других маркеров хронического воспаления — ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-8, фибриногена [16]. По данным M. Cazzola и соавт., при ХОБЛ уровень СРБ обратно пропорционален значению ОФВ1 [17]. По результатам исследования A. Agusti и соавт., ИЛ-6 и СРБ повышают риск развития СД 2 типа [18].

Оксидативный стресс рассматривается как дисбаланс окислительных и антиокислительных процессов. У больных ХОБЛ и при обострении, и вне обострения оксидативный стресс индуцируется вдыханием экзогенных окислителей, в большинстве случаев табачного дыма, а также активацией лейкоцитов, выделяющих активные формы кислорода, вызывающие повреждение тканей, что создает условия для хронизации воспаления [19].

При СД 2 типа оксидативный стресс развивается за счет увеличения количества активных форм кислорода, уменьшения числа антиоксидантов, а также перекисного окисления липидов. Оксидативный стресс, вызываемый ингаляцией табачного дыма у больных ХОБЛ, способствует ИР. Оксидативный стресс при СД 2 типа усиливает оксидативный стресс при ХОБЛ даже на фоне терапии глюкокортикостероидами (ГКС) [20]. Курение индуцирует оксидативный стресс, вызывающий системное воспаление. В то же время курение рассматривается в качестве главного фактора риска развития ХОБЛ и одного из независимых, модифицируемых факторов развития СД 2 типа [21].

При ХОБЛ оксидативный стресс поддерживает состояние гипоксии — фактора риска развития СД 2 типа. Индукция большого количества активных форм кислорода может приводить к хронической гипергликемии, увеличению синтеза коллагена, опосредованного высокими уровнями конечных продуктов

усиленного гликозилирования, оказывать повреждающее действие на ткани легких [22].

Гипоксия вызывает существенные изменения в метаболизме. У здоровых людей в условиях высокогорья наблюдается увеличение ИР и продукции глюкозы печенью с повышенной чувствительностью к инсулину на периферии и усиление усвоения глюкозы скелетными мышцами. Вероятно, β -клетки поджелудочной железы чувствительны к гипоксия-индуцированным повреждениям, независимо от характера гипоксии [23].

Действительно, хроническая гипоксия часто сочетается с нарушением толерантности к глюкозе (НТГ), пониженной чувствительностью к инсулину, сопровождаемой выраженным липолизом. И, напротив, у больных ХОБЛ с нормальной сатурацией кислорода может наблюдаться уменьшение выраженности НТГ и повышение чувствительности к инсулину. Возможно, и ХОБЛ и СД 2 типа объединяют общие патофизиологические механизмы, где промежуточным звеном выступает гипоксия-индуцируемый фактор [24]. Хроническое системное воспаление, оксидативный стресс, гипергликемия вызывают дисфункцию дыхательной мускулатуры. Снижение легочной функции у больных СД 2 типа кроме того может быть связано с увеличением осмолярности крови за счет гипергликемии, и в свою очередь является независимым прогностическим фактором развития СД 2 типа [5, 6]. Н.С. Yen и соавт. (2012) продемонстрировали, что развитию СД 2 типа предшествуют изменения функции легких, которые значительно прогрессируют при манифестации СД [25]. М. Cazzola и соавт. (2012), обнаружили, что гипергликемия приводит к развитию гиперреактивности дыхательных путей. Повышение бронхиальной реактивности в ответ на стимуляцию глюкозой, вероятно, происходит из-за повышенной активации особенного внутриклеточного Rho/ROCK пути (Rho-ассоциированной киназы), играющего роль в регуляции тонуса гладкой мускулатуры бронхов. Активация этого пути опосредует множество биологических функций, связанных с сократимостью мышечных волокон на основе актин-миозина. Более того, Rho/ROCK путь вместе с мобилизацией внутриклеточного кальция играют не последнюю роль в снижении функции легких у больных СД 2 типа [4]. Общеизвестно, гиперчувствительность дыхательных путей является фактором риска ускоренного снижения ОФВ₁, в том числе у больных ХОБЛ [25].

Лечение

Тесная связь ХОБЛ и СД 2 типа объясняется с позиции вероятных общих факторов риска, патогенетических механизмов, а также возможных вариан-

тов лечения. Терапия ГКС — один из спорных вопросов в условиях ассоциации ХОБЛ и СД 2 типа. Так, С.С. Slatore и соавт. показали, что применение ингаляционных ГКС коррелирует с увеличением уровня глюкозы крови у пациентов с СД 2 типа, и характеризуется доза-зависимым эффектом [26]. По результатам исследования J.A. Walters и соавт. краткосрочное лечение системными ГКС при обострении ХОБЛ связано с 5-кратным увеличением риска гипергликемии, а длительное использование системных ГКС при стабильном течении ХОБЛ напрямую коррелирует с повышенным риском развития НТГ [27].

Однако результаты оценки фактического воздействия ингаляционных ГКС на риск развития СД 2 типа при ХОБЛ противоречивы. По данным J.L. Faul и соавт., у пациентов с СД 2 типа было выявлено небольшое, но статистически значимое увеличение уровня гликозилированного гемоглобина через 6 нед на фоне лечения ГКС, однако клинически значимого влияния на долгосрочный гликемический профиль не было [28].

По данным Р.М. О'Вутне и соавт., лечение больных ХОБЛ будесонидом в виде монотерапии или в комбинации с формотеролом не было связано ни с повышенным риском развития СД 2 типа, ни с риском НТГ [29]. Несоответствие представленных данных ставит под сомнение реальное влияние ингаляционных ГКС на развитие СД 2 типа. Однако, применение ингаляционных ГКС на определенных стадиях ХОБЛ обязательно, но с учетом нежелательных побочных эффектов, должна быть подобрана оптимальная доза препаратов [30].

Что касается ингаляционных бронходилататоров, недостаточно данных о степени их влияния при сочетании ХОБЛ и СД 2 типа. Метаанализ, представленный S. Kesten и соавт., показал, что у больных ХОБЛ на фоне приема тiotропия бромидом не наблюдалось значимого роста риска развития СД 2 типа по сравнению с группой контроля, однако относительный риск развития гипергликемии составил 1,69 [31].

На сегодняшний день у пациентов с СД 2 типа метформин рассматривается в качестве препарата первой линии, снижающего риск сердечно-сосудистых осложнений и смерти. Однако в единичных случаях прием метформина может привести к лактоацидозу, в том числе со смертельным исходом, поэтому применение данного препарата при ХОБЛ, сопровождающейся хронической гипоксией, неоднозначно [32]. По данным Н.К. Kim и соавт., у больных ХОБЛ и СД 2 типа лечение пероральными сахароснижающими препаратами способствовало улучшению ФЖЕЛ [33]. Р. Sexton и соавт. отметили увеличение силы дыхательной мускулатуры на фоне приема мет-

формина у пациентов с СД 2 типа и ХОБЛ [34]. По данным A.W. Hitchings и соавт. прием метформина у пациентов с СД 2 типа и ХОБЛ не ассоциировался с клинически значимым повышением концентрации лактата крови, оказывал плейотропные противовоспалительные, антиоксидантные эффекты, ограничивая поток глюкозы через эпителий дыхательных путей, препятствуя распространению респираторных инфекций [35].

M. Guazzi и соавт. изучали влияние терапии инсулином или пероральными сахароснижающими препаратами на легочную функцию у больных СД 2 типа. По-видимому, СД 2 типа ассоциируется с уменьшением микрососудистых альвеолярных резервов, что проявляется снижением объема легких, ухудшением альвеолярной перфузии. Диффузионная способность легких по углекислому газу (DLCO) является маркером функции альвеолярно-капиллярной мембраны, газотранспортную функцию крови. Терапия инсулином улучшала DLCO у пациентов с СД 2 типа за счет облегчения проводимости альвеолярно-капиллярного барьера по сравнению с приемом пероральных сахароснижающих препаратов [36].

Основываясь на возможной роли инсулина в улучшении газообмена в легких, в 2006 г. было одобрено использование ингаляционной формы препарата, которая способствовала улучшению DLCO и ОФВ1. Однако, абсорбция вдыхаемого инсулина оказалась непредсказуема. Кроме того, у бывших курильщиков ингаляции инсулина увеличивали скорость развития карциномы бронхов. С учетом этого, в 2007 г. было прекращено использование ингаляционной формы инсулина [37].

Заключение

Связь между ХОБЛ и СД 2 типа подтверждается эпидемиологически, общими патогенетическими механизмами, побочными эффектами препаратов, используемых в их лечении. Сложность этой ассоциации заключается в том, что ХОБЛ рассматривается как один из факторов риска развития СД 2 типа. Патологический процесс, объединяющий ХОБЛ и СД 2 типа — хроническое системное воспаление. Действительно, СРБ, ИЛ-6, ФНО- α влияют на метаболические процессы, ИР. ХОБЛ за счет хронической гипоксии поддерживает оксидативный стресс. В этом аспекте ХОБЛ можно рассматривать как системное заболевание с патофизиологическими процессами, некоторые из которых сходны при развитии СД 2 типа. Среди предполагаемых патогенетических механизмов ассоциации ХОБЛ и СД 2 типа рассматривается гипергликемия. Гипергликемия и ИР ассоциированы с прогрессированием ХОБЛ и

СД 2 типа. Глюкоза может непосредственно модулировать тонус гладкой мускулатуры дыхательных путей через активацию особого внутриклеточного Rho/ROCK пути. Но данное направление требует дальнейшего изучения.

Таким образом, необходимо проводить научную и клиническую работу по определению и более глубокому изучению точных механизмов ассоциации ХОБЛ и СД 2 типа с целью разработки методов их коррекции, профилактики и подбора адекватных комбинированных схем лечения пациентов с данной коморбидной патологией.

References

1. International Diabetes Federation, Diabetes Atlas, 5th ed. International Diabetes Federation; 2013. Available at: http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf
2. Ehrlich SF, Quesenberry Jr CP, Van Den Eeden SK, Shan J, Ferrara A. Patients diagnosed with diabetes are at increased risk for asthma, COPD, pulmonary fibrosis, and pneumonia but not lung cancer. *Diabetes Care*. 2010; 33(1): 55-60.
3. Rogliani P, Calzetta L, Segreti A, Barrile A, Cazzola M. Diabetes among outpatients with COPD attending a university hospital. *Acta Diabetologica*. 2014; 51(6): 933-40.
4. Cazzola M, Calzetta L, Rogliani P, Lauro D, Novelli L, Page CP, et al. High glucose enhances responsiveness of human airways smooth muscle via the Rho/ROCK pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012; 47(4): 509-16.
5. Lazarus R, Sparrow D, Weiss ST. Baseline ventilatory function predicts the development of higher levels of fasting insulin and fasting insulin resistance index: the Normative Aging Study. *Eur Respir J*. 2008; 12(3): 641-5.
6. Engstrom G, Janzon L. Risk of developing diabetes is inversely related to lung function: a population-based cohort study. *Diab Med*. 2012; 19(2): 167-70.
7. Song Y, Klevak A, Manson JE, Buring JE, Liu S. Asthma, COPD, and type 2 diabetes in the Women's Health Study. *Diab Res Clin Prac*. 2010; 90(3): 365-71.
8. Feary JR, Rodrigues LC, Smith CJ, Hubbard RB, Gibson JE. Prevalence of major comorbidities in subjects with COPD and incidence of myocardial infarction and stroke: a comprehensive analysis using data from primary care. *Thorax*. 2010; 65(11): 956-62.
9. Hersh CP, Make BJ, Lynch DA, Barr RG, Bowler RP, Calverley PM, et al. Non-emphysematous COPD is associated with diabetes. *BMC Pulmonary Medicine*. 2014; 14: 164.
10. MacNee W. Systemic inflammatory biomarkers and co-morbidities of COPD. *Ann Med*. 2013; 45(3): 291-300.
11. Miller J, Edwards LD, Agusti A, Bakke P, Calverley PM, Celli B, et al. Comorbidity, systemic inflammation and outcomes in the ECLIPSE cohort. *Res Med*. 2013; 107(9): 1376-84.
12. Mirrakhimov AE. COPD and glucose metabolism: a bitter sweet symphony. *Cardiovasc Diabetol*. 2012; 11: 132.
13. Wedzicha JA, Seemungal TA, MacCallum PK, Paul EA, Donaldson GC, Bhowmik A, et al. Acute exacerbations of COPD are accompanied by elevations of plasma fibrinogen and serum IL-6 levels. *Thromb Haemost*. 2010; 84(2): 210-5.

14. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between COPD and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax*. 2014; 59(7): 574-80.
15. Franciosi LG, Page CP, Celli BR, Cazzola M, Walker MJ, Danhof M, et al. Markers of exacerbation severity in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2011; 7: 74.
16. Garcia-Rio F, Miravittles M, Soriano JB, Munoz L, Duran-Tauleria E, Sanchez G, et al. Systemic inflammation in COPD: a population-based study. *Respir Res*. 2010; 11: 63.
17. Cazzola M, Matera MG, Rogliani P, Page C. Treating systemic effects of COPD. *Trends Pharmacol Sci*. 2011; 28(10): 544-50.
18. Agusti A, Faner R. Systemic inflammation and comorbidities in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2012; 9(2): 43-6.
19. Anderson D, Macnee W. Targeted treatment in COPD: a multi-system approach for a multi-system disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2009; 4: 321-35.
20. Wells CE, Baker EH. Metabolic syndrome and European Respiratory Monograph 59: COPD and Comorbidity. *Eur Res Monograph*. 2013; 59: 117-34.
21. Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Res J*. 2011; 31(6): 1334-56.
22. MacNee W Oxidants and COPD. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2010;4(6):627-41.
23. Gamboa JL, Garcia-Cazarin ML, Andrade FH. Chronic hypoxia increases insulin-stimulated glucose uptake in mouse soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011; 300(1):R85-91.
24. Jakobsson P, Jorfeldt L, von Schenck H. Fat metabolism and its response to infusion of insulin and glucose in patients with advanced COPD. *Clin Physiol*. 2013; 15(4): 319-29.
25. Yeh HC, Punjabi NM, Wang NY, Pankow JS, Duncan BB, Cox CE, et al. Cross-sectional and prospective study of lung function in adults with type 2 diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Diabetes Care*. 2012; 31(4): 741-6.
26. Slatore CG, Bryson CL, Au DH. The association of inhaled corticosteroid use with serum glucose concentration in a large cohort. *Am J Med*. 2009; 122(5): 472-8.
27. Walters JA, Gibson PG, Wood-Baker R, Hannay M, Walters EH. Systemic corticosteroids for acute exacerbations of COPD. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;1.
28. Faul JL, Wilson SR, Chu JW, Canfield J, Kuschner WG. The effect of an inhaled corticosteroid on glucose control in type 2 diabetes. *Clin Med Res*. 2009; 7(1-2):14-20.
29. O'Byrne PM, Rennard S, Gerstein H, Radner F, Peterson S, Lindberg B, et al. Risk of new onset diabetes mellitus in patients with asthma or COPD taking inhaled corticosteroids. *Res Med*. 2012; 106(11): 1487-93.
30. Matera MG, Cardaci V, Cazzola M, Rogliani P. Safety of inhaled corticosteroids for treating chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin Drug Saf*. 2015; 14(4): 533-41.
31. Kesten S, Jara M, Wentworth C, Lanes S. Pooled clinical trial analysis of tiotropium safety. *Chest*. 2006; 130(6): 1695-703
32. Salpeter SR, Greyber E, Pasternak GA, Salpeter EE. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010; 4.
33. Kim HJ, Lee JY, Jung HS, Kim DK, Lee SM, Yim JJ, et al. The impact of insulin sensitizers on lung function in patients with COPD and diabetes. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2010;14(3):362-7.
34. Sexton P, Metcalf P, Kolbe J. Respiratory effects of insulin sensitisation with metformin: a prospective observational study. *COPD*. 2014; 11(2): 133-42.
35. Hitchings AW, Archer JR, Srivastava SA, Baker EH. Safety of Metformin in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *COPD*. 2014
36. Guazzi M, Oreglia I, Guazzi MD. Insulin improves alveolar-capillary membrane gas conductance in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2012; 25(10): 1802-6.
37. Ceglia L, Lau J, Pittas AG. Meta-analysis: efficacy and safety of inhaled insulin therapy in adults with diabetes mellitus. *Ann Int Med*. 2006; 145(9): 665-75.

Сведения об авторах:

Кожевникова Светлана Алексеевна, канд. мед. наук, ассистент каф. общей врачебной практики (семейной медицины) ИДПО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко; e-mail: kozhevnikova_s_a@mail.ru

Будневский Андрей Валериевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. факультетской терапии ВГМУ им. Н.Н. Бурденко, e-mail: avbudnevski@vsmaburdenko.ru

Овсянников Евгений Сергеевич, канд. мед. наук, доцент каф. факультетской терапии ВГМУ им. Н.Н. Бурденко, e-mail: e.ovsjannikov@vsmaburdenko.ru

Малыш Елена Юрьевна, канд. мед. наук, ассистент каф. факультетской терапии ВГМУ им. Н.Н. Бурденко, e-mail: e.malysh@vsmaburdenko.ru

Белов Владислав Николаевич, доктор мед. наук, проф. каф. терапии ИДПО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко, e-mail: doc.belov@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616-092

Горкун А.А.¹, Кожина К.В.¹, Зурина И.М.¹, Кошелева Н.В.¹, Сабурина И.Н.^{1,2}

Патофизиологические и молекулярные механизмы резорбции белков внеклеточного матрикса при старении кожи и пути их восстановления

¹ — ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д.8

² — ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, 123995, Москва, Баррикадная ул, д. 2/1, стр.1

Представлен краткий обзор наиболее изученных молекулярных механизмов, приводящих к старению кожи. В обзоре представлены механизмы клеточного старения, окислительного стресса, хронического воспаления, а также процессы синтеза и деградации белков внеклеточного матрикса. Также рассмотрены подходы к восстановлению структуры матрикса с помощью различных антивозрастных препаратов.

Ключевые слова: старение кожи; окислительный стресс; внеклеточный матрикс; вартонов студень.

Для цитирования: Горкун А.А., Кожина К.В., Зурина И.М., Кошелева Н.В., Сабурина И.Н. Патофизиологические и молекулярные механизмы резорбции белков внеклеточного матрикса при старении кожи и пути их восстановления. *Патологическая физиология и экспериментальная медицина*. 2016; 60(4): 128—133.

Для корреспонденции: Горкун Анастасия Алексеевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИОПП», e-mail: stgork@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

Поступила 19.04.2016

Gorkun A.A.¹, Kozhina K.V.¹, Zurina I.M.¹, Kosheleva N.V.¹, Saburina I.N.^{1,2}

Pathophysiological and molecular mechanisms of extracellular matrix protein resorption during skin aging, and the ways to their restoration

¹ — FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 125315, Russian Federation, Moscow, Baltiyskaya st., 8

² — Russian Medical Academy of Postgraduate Education, 123995, Russian Federation, Moscow, Barrikadnaya st., 2/1

The article is a short review of the most studied molecular mechanisms leading to skin aging. It considers mechanisms of cellular aging, oxidative stress, development of chronic inflammation, as well as synthesis and degradation of extracellular matrix proteins. The review also contains examples of extracellular matrix restoration using cell and pharmacological technologies.

Keywords: skin aging, oxidative stress, extracellular matrix, Warton's jelly.

For citation: Gorkun A.A., Kozhina K.V., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Saburina I.N. Pathophysiological and molecular mechanisms of extracellular matrix protein resorption during skin aging, and the ways to their restoration. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (4): 128—133. (in Russian).

For correspondence: Anastasiya A. Gorkun, PhD, Leading Researcher work Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 125315, Russian Federation, Moscow, Baltiyskaya st., 8, e-mail: stgork@gmail.com

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Gorkun A.A., <http://orcid.org/0000-0001-5859-812X>

Kozhina K.V., FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», Ltd «Premier-Pharm»

Zurina I.M., <http://orcid.org/0000-0002-3275-0215>

Kosheleva N.V., <http://orcid.org/0000-0002-2665-4972>

Saburina I.N., <http://orcid.org/0000-0003-2014-2535>

Received 19.04.2016

Старение кожи является многофакторным патофизиологическим процессом, обусловленным внешними (экзогенное старение) и внутренними (эндогенное или хронологическое старение) стимулирующими факторами. Основным внешним воздействием является влияние ультрафиолетового излучения (УФ) типа А и Б, которое приводит к повышенной продукции активных форм кислорода (АФК), активирующих матричные металлопротеиназы (ММП) и подавляющих синтез нового коллагена. Фотостарение кожи приводит к утолщению и атрофии эпидермального слоя за счет накопления дезорганизованного коллагена и эластина, что сопровождается глубокими морщинами, пигментными пятнами, пожелтением кожи, сухостью, телеангиоэктазией, предопухолевыми поражениями, дряблостью кожи, атрофией, эластозом и актинической пурпурой [1]. Внутренние факторы включают три основных процесса:

- 1) снижение пролиферативной активности клеток кожи;
- 2) снижение синтеза внеклеточного матрикса;
- 3) увеличение экспрессии ферментов, резорбирующих внеклеточный матрикс [2].

Эндогенное старение кожи приводит к утоньшению слоя эпидермиса и появлению мелких морщинок, вялости овала лица и доброкачественных новообразований [3].

Однако старение кожи не является неким обособленным процессом, оно представляет собой результат развития различных патологических состояний, таких, как: хроническое воспаление, клеточное старение, повреждение клеточной и митохондриальной ДНК, окислительный стресс, накопление хромосомных аберраций и точечных мутаций, а также изменение гормонального статуса организма [1]. Совокупность данных процессов и составляет основу патогенеза старения кожи.

Угнетение функциональной активности кожи тесно связано с клеточным старением. Ранее данный процесс рассматривали как необратимый механизм останковки клеточного цикла, который необходим для защиты организма от образования опухолей, но последние открытия показали, что «клеточное старение» также является неотъемлемым участником эмбриогенеза и репарации. Новые данные свидетельствуют о том, что клеточное старение представляет собой не статическую конечную точку, а ряд прогрессирующих фенотипически различных клеточных состояний, приобретенных после первоначальной останковки клеточного цикла в точке G1 и перехода клеток в стадию G0. Данный процесс может быть вызван как внутренними, так и внешними факторами и в некоторых случаях может быть обратимым [4].

В результате старения клетки оказываются способны только к ограниченному числу делений, после которого они достигают предела Хейфлика, когда клетки не могут под влиянием собственных митогенов перейти на стадию клеточного цикла S1 — синтеза ДНК. Это обусловлено снижением теломеразной активности [5] и супрессией генов, контролирующих клеточный цикл и синтез ДНК: протоонкогена *c-Fos*, белков с мотивом «спираль-петля-спираль» *Id 1* и *Id 2* и транскрипционных факторов семейства E2F [2]. При этом повышается экспрессия негативных регуляторов роста, включая ингибиторы циклин-зависимой протеинкиназы *p21* и *p16*. Изменения, наблюдаемые в стареющих фибробластах, связаны с увеличением экспрессии ИЛ1 и нейрорегулина — цитокина, подобного эпидермальному фактору роста [6].

В процессе клеточного старения клетки кожи постепенно накапливают множество повреждений и репликативных ошибок в структуре ДНК. Показано, что это приводит к снижению пролиферативной и синтезирующей активности дермальных фибробластов [7]. В результате накопления ошибок многие, но не все типы клеток приобретают устойчивость к определенным апоптотическим сигналам. Например, стареющие фибробласты человека могут противостоять индуцированному апоптозу, а эндотелиальные клетки — нет. Стареющие фибробласты человека резистентны к апоптозу, обусловленному отсутствием ростовых факторов и окислительным стрессом, но не к апоптозу, вызванному активацией рецептора смерти клеток *Fas*. Стареющие кератиноциты также становятся устойчивыми к апоптозу, тогда как количество клеток Лангерганса снижается на 50% к 80 годам жизни, а размер популяции меланоцитов снижается на 8—20% каждую декаду после 30 лет. Устойчивость к апоптозу может частично объяснить, почему стареющие клетки стабильны в культуре. Клеточное старение и апоптоз считаются защитными механизмами организма от новообразований, и в качестве триггера между этими механизмами выступает белок-супрессор опухолей — *p53*. Однако сигнальные пути и факторы, влияющие на переход клеток в то или иное состояние, остаются малоизученными [8].

Ведущую роль в патогенезе старения кожи, по мнению авторов многих исследований, играет окислительный стресс, который может быть обусловлен как внешними, так и внутренними факторами. При эндогенном старении его развитие чаще всего связывают со снижением активности антиоксидантных ферментов, включая *Cu,Zn*-супероксиддисмутазу, каталазу и глутатионпероксидазу [9]. При экзогенном или фотостарении, увеличение продукции супероксида вызвано переносом электрона с нескольких УФ-абсорбирующих хромофоров, таких, как НАДН,

НАДФН, триптофан, рибофлавин или транс-урокаиновая кислота, на молекулярный кислород [10, 11]. Супероксид под влиянием супероксиддисмутазы образует H_2O_2 , которая в присутствии переходных металлов, например, железа и меди, подвергается конверсии в высокореактивный гидроксильный радикал $HO\cdot$. Эти соединения способны активировать некоторые сигнальные белки: Raf, протеин-тирозин-фосфатазы (PTPases) и MEK1.

В результате происходит повышение уровня экспрессии активирующего протеина 1 (AP-1), стимулирующего активность матричных металлопротеиназ 1, 3 и 9 (MMP1, 3, 9), что приводит к разрушению внеклеточного матрикса кожи. В то же время АФК снижают содержание фактора TGF- β 2, отвечающего за синтез нового коллагена. Таким образом, формируется дисбаланс белков внеклеточного матрикса [3]. В дополнение, воздействие УФ снижает синтез ростовых факторов и увеличивает экспрессию тромбоспондина-1 (TSP-1) — ингибитора ангиогенеза, что приводит к ухудшению кровоснабжения кожи и снижению репаративной активности клеток [12].

Под воздействием УФ-облучения и увеличения продукции АФК в коже развивается хроническое воспаление. В упрощенном виде, это связывают с повреждением ДНК и образованием тимидиновых димеров, активирующих нейроэндокринную систему, что приводит к иммуносупрессии и реализации нейроэндокринных медиаторов, таких как пептиды проопиомеланокортина — адренкортикотропного гормона, бета-липотропного гормона и бета-эндорфина. В результате увеличивается синтез провоспалительных факторов в различных клетках кожи. АФК вступают в реакции перекисного окисления с фосфолипидами клеточных мембран. В результате реакций перекисного окисления липидов, а также активации фосфолипаз образуется избыточное количество арахидоновой кислоты, которая является предшественником провоспалительных эйкозаноидов — простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов [13, 14]. Так, простагландин E2 (ПГЕ2) является основным медиатором развития эритемы при солнечном ожоге [15]. Ферментом, регулирующим синтез ПГЕ2 является индуцируемая форма циклооксигеназы — ЦОГ2, которая активируется под воздействием таких факторов как свет, факторы роста и цитокины [16]. Показано, что, в отличие от молодой, в стареющей коже УФ-излучение эффективнее стимулирует экспрессию ЦОГ2 и ПГЕ2, что делает ее более чувствительной к повреждающему воздействию и развитию фотостарения [17]. Провоспалительные факторы увеличивают проницаемость кровеносных сосудов, что приводит к инфильтрации и активации нейтрофилов и макрофагов в коже. Нейтрофилы продуцируют эластазы

и другие протеазы, например, катепсин G, которые вызывают реакцию воспаления и активируют матричные металлопротеиназы, вызывая аномальную деградацию внеклеточного матрикса и аккумуляцию нефункциональных матричных компонентов [18]. Воздействие УФ стимулирует в кератиноцитах синтез фактора некроза опухоли ФНО- α и интерлейкина 1 (ИЛ1). Разными авторами показано, что индукцию экспрессии ИЛ1 и ФНО- α в кератиноцитах обеспечивает транскрипционный фактор NF- κ B, который активируется в клетках под воздействием УФ-излучения. В дальнейшем активированные провоспалительные факторы дополнительно по принципу положительной обратной связи усиливают экспрессию NF- κ B [19, 20]. Далее в клетках кожи увеличивается продукция ИЛ 3, 6, 7, 10 и, под влиянием УФ излучения типа Б, ИЛ12. Также повышается секреция гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF). Из клеток кожи цитокины попадают в кровоток и могут стать причиной системного воспаления [18]. Подобную картину воспалительной реакции, приводящую к хроническому воспалению кожи и ее старению, можно наблюдать и без воздействия УФ — при различных патологиях процесса заживления ран [21]. Кроме провоспалительных цитокинов под воздействием УФ в кератиноцитах активируется секреция и других ростовых факторов, которые могут ингибировать эффекты УФ и защищать клетки кожи от его дальнейшего повреждающего воздействия. Это антагонист рецептора ИЛ1, α -меланоцит стимулирующий гормон (α -MSH), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), оксид азота (NO), основной фактор роста фибробластов (b-FGF), фактор роста нервов (NGF) и эндотелин-1 [18].

Описанные патофизиологические процессы приводят к дезорганизации внеклеточного матрикса, резорбции базальной мембраны, изменению соотношения коллагенов I, III и IV типов [22], и, как следствие, к нарушению нормальной физиологии кожи, снижению ее защитных свойств и развитию заболеваний. Это вызвано стимуляцией синтеза двух ключевых разрушающих матрикс ферментов — коллагеназы (MMP1) и стромолизина (MMP3), при одновременной супрессии их ингибиторов — TIMP 1 и TIMP 3, соответственно. Предполагается, что АФК и при эндогенном, и при экзогенном старении через ГТФ-связывающие белки, включая белки gas, gas и cdc42, могут стимулировать MAPK (митоген активирующие протеинкиназы) сигнальный путь, активируя три MAP киназы — p38, JNK и ERK. Они, в свою очередь, индуцируют экспрессию транскрипционных факторов, как, например, C-Jun и c-Fos, входящих в состав транскрипционного комплекса

AP-1, ингибирующего действие TGF- β и стимулирующего MMP 1, 3 и 9 [2, 12]. Усиление деградации внеклеточного матрикса происходит через активацию транскрипционного фактора NF- κ B [12].

TGF- β через Smad белки контролирует активацию генов COL1A1 и COL3A1, запускающих синтез проколлагенов 1 и 3 [23]. Соответственно, ингибирование TGF- β сигнального пути приводит к блокаде образования нового коллагена. Однако, как показали недавние исследования, не только снижение экспрессии TGF- β может стать причиной угнетения синтеза коллагена. Под влиянием уменьшения в размерах и механической силы натяжения фибробластов, снижается количество рецепторов к TGF- β на мембране клеток, что также приводит к снижению синтеза коллагена [24]. Это согласуется с выводами более ранних работ и обзоров о том, что деградация внеклеточного матрикса кожи не имеет линейной зависимости от внешнего воздействия ультрафиолета, и функциональное состояние фибробластов зависит, в первую очередь, от механической стимуляции, оказываемой внеклеточным матриксом. Следовательно, резорбция и дезорганизованная укладка белков ВКМ приводят к снижению синтеза необходимых для поддержания гомеостаза кожи цитокинов и стимулируют ее старение [25]. В отличие от синтеза коллагенов I и III типа, который контролируется через семейство Smad белков и TGF- β , продукция коллагена IV и ламинина индуцируется через Akt/PKB сигнальный путь и NF- κ B систему [26]. Снижение количества коллагена IV типа в базальной мембране начинается после 35 лет, и ранее этот процесс считался необратимым [27]. Последние исследования показали, что малая некодирующая микроРНК — miR-29 способна оказывать влияние на уровень экспрессии коллагена IV. В своей работе на линии быстро стареющих мышей авторы обнаружили, что увеличение экспрессии miR-29 ведет к подавлению синтеза коллагена IV типа как *in vitro*, так и *in vivo* и предположили, что именно этот фактор отвечает за уменьшение количества сетевидного коллагена с возрастом [28].

Основываясь на данных о вышеописанных механизмах были разработаны препараты, применяемые на различных этапах старения кожи. В качестве профилактических препаратов наиболее распространены УФА- и УФА-протекторы и препараты, содержащие антиоксиданты. Антиоксиданты могут быть как энзимными, так и неэнзимными. К неэнзимным относят — аскорбиновую кислоту, коэнзим Q10, витамин E, никотинамид и β -каротин. Также антиоксидантную и противовоспалительную активность могут проявлять витамин C и полифенолы. Препараты ретиноидного ряда предотвращают деградацию коллагена за счет ингибирования ядерного транскрипционного фактора

AP-1. Также возможна гормональная терапия, но результаты клинических исследований противоречивы, поэтому данный тип лечения требует исключительно индивидуального подхода и строгого контроля [12].

При обширных повреждениях кожи и поздних стадиях разрушения внеклеточного матрикса, наибольшего эффекта можно добиться с помощью цитокинов и ростовых факторов. Несколько пилотных клинических исследований, проведенных за последнюю декаду, показали положительный эффект местного применения факторов роста на омоложение кожи и исчезновение признаков и симптомов старения кожи [29]. Однако применение одиночных факторов роста представляется малоэффективным, так как *in vivo* в поддержании нормального функционирования фибробластов и их микроокружения задействовано множество различных сигнальных каскадов, активируемых разными лигандами. При этом важно еще и соотношение этих цитокинов: оно должно быть максимально приближено к условиям *in vivo*.

Сегодня биотехнологии открывают путь к применению широкого спектра эффективных и инновационных косметических активных веществ, способных к восстановлению синтеза и нормальной ориентации белков ВКМ. В качестве источника природных цитокинов может выступить вартонов студень пупочного канатика человека, который состоит преимущественно из гиалуроновой кислоты, коллагенов I и IV типов, а также содержит множество цитокинов и факторов роста, стимулирующих синтез белков ВКМ [30]. Было показано, что добавление экстракта пупочного канатика человека в культуральную среду усиливало продукцию фибробластами коллагена I типа, экспрессию кератиноцитами факторов роста TGF- β , bFGF, IGF и других, а в меланоцитах индуцировало экспрессию тирозинкиназы, увеличивающей количество меланина [31]. В другом исследовании добавление среды, кондиционированной мультипотентными мезенхимными стромальными клетками (ММСК) вартонова студня, привело к увеличению в культуре фибробластов экспрессии генов, вовлеченных в реэпителизацию при повреждении кожи (TGF β 2), а также неоваскуляризацию (индуцируемый гипоксией фактор — HIF1 α) и пролиферацию фибробластов (ингибитор-1 активатора плазминогена) [32]. Однако массовое производство данных экстрактов и их применение в клинической практике неперспективно, так как каждый образец нуждается в тщательной проверке биологической безопасности. Поэтому количество исследований в этой области малочисленно.

Большой интерес вызывают синтетические олигопептиды, разработанные на основе природных аналогов. Биологически активные пептиды играют важную роль во многих процессах, имеющих отношение

к уходу за кожей, таких, как модуляция пролиферации и миграции клеток, воспаление, ангиогенез, меланогенез и синтез белков внеклеточного матрикса. Кроме того, пептиды в основном состоят из L-аминокислот, которые в общем случае не являются иммуногенными и легко утилизируются организмом. В настоящее время фармацевтическая индустрия выпускает множество пептидов, направленных на регуляцию различных патологических процессов в коже: УФ-протекцию, воспаление, аутоиммунную реакцию и т.д. [33]. Одними из наиболее перспективных препаратов в последние годы рассматриваются искусственно синтезированные олигопептиды. Например, олигопептид р199 (sh-oligopeptide 72), который, по описанию авторов, был разработан на основе белков вартонова студня, является их аналогом и может быть использован в составе омолаживающего препарата. Пептид состоит из 72 аминокислот, его молекулярная масса составляет 8,4 кДа. Было показано, что данный олигопептид стимулирует пролиферацию фибробластов и стволовых клеток кожи, а также увеличивает количество волокон ВКМ в дерме [34, 35]. В исследованиях *in vitro* было установлено, что добавление р199 в культуральную среду к стареющим фибробластам активизирует синтез определенных белков ВКМ, характерных для молодой кожи — коллагена IV типа и фибронектина [36, 37]. При этом уровень экспрессии коллагена IV типа строго увеличивался с повышением концентрации олигопептида. Также, на модели повреждения монослоя, было установлено, что олигопептид способен увеличить скорость заживления раневой поверхности за счет стимуляции миграции клеток. Добавление олигопептида к 3D культуре стареющих фибробластов стимулировало образование сфероидов, что свидетельствует о восстановлении мезенхимо-эпителиальной пластичности клеток за счет восстановленной способности синтезировать компоненты внеклеточного матрикса (фибронектин и коллагены) в достаточном для установления межклеточных контактов количестве [38].

Процесс старения кожи является совокупностью различных патофизиологических состояний организма человека и, несомненно, требует системного подхода для его изучения и коррекции. Накопление ассоциированных со старением заболеваний усиливает и развивает угнетение всех функций организма. Кожа человека одной из первых начинает терять свою биологическую активность вследствие разрушения ВКМ и дезорганизации системы органа. Основным подходом к восстановлению гомеостаза кожи является подавление процессов хронического воспаления и окислительного стресса. Однако данный подход является недостаточным, так как для формирования правильной архитектуры и поддержания функциональности кожи

требуется быстрый синтез нового материала ВКМ. Поэтому наиболее перспективным путем развития антивозрастных препаратов представляется разработка синтетических олигопептидов, способных активировать сразу несколько сигнальных каскадов, под тщательным контролем их биологической активности на клеточных моделях.

References

1. Makrantonaki E., Zouboulis C.C. Molecular mechanisms of skin aging: state of the art. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007; 1119: 40-50.
2. Jenkins G. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech. Ageing Dev.* 2002; 123(7): 801-10.
3. Helfrich Y.R., Sachs D.L., Voorhees J.J. Overview of skin aging and photoaging. *Dermatol. Nurs.* 2008; 20(3): 177-83.
4. van Deursen J. M. The role of senescent cells in ageing. *Nature.* 2014; 509(7501): 439-46.
5. Gagnani, A., Mac Cornick, S., Chominski, V., de Noronha, S. M. R., de Noronha, S.A.A.C., & Ferreira, L.M. Review of major theories of skin aging. *Advances in Aging Research.* 2014; Vol. 3: 265-84.
6. Zouboulis C. C., Makrantonaki E. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. *Clinics in dermatology.* 2011; 29 (1): 3-14.
7. Fore J. A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy Wound Manage.* 2006; 52(9): 24-35.
8. Campisi J., di Fagagna F. A. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2007; 8(9): 729-40.
9. Kohen R., Gati I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. *Toxicology.* 2000; Vol. 148: 159-67.
10. Slominski A., Tobin D.J., Shibahara S., Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.* 2004; 84(4): 1155-228.
11. Rittie L., Fisher G.J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing research reviews.* 2002; 1(4): 705-20.
12. Kohl E., Steinbauer J., Landthaler M., Szeimies R.M. Skin ageing. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2011; 25(8): 873-84.
13. Matsumura Y., Ananthaswamy H.N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and applied pharmacology.* 2004; 195(3): 298-308.
14. Hruza L. L., Pentland A. P. Mechanisms of UV-induced inflammation. *Journal of Investigative Dermatology.* 1993; 100(1): 35-41.
15. Gilchrist B.A., Soter N.A., Stoff J.S., Mihm M.C. The human sunburn reaction: histologic and biochemical studies. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 1981; 5(4): 411-22.
16. Smith W.L., Meade E.A., Dwitt D.L. Pharmacology of Prostaglandin Endoperoxide Synthase Isozymes?1 and?2a. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1994; 714(1): 136-42.
17. Seo J.Y., Kim E.K., Lee S.H., Park K.C., Kim K.H., Eun H.C., Chung J.H. Enhanced expression of cytochrome P-450 2B6 by UV in aged human skin *in vivo.* *Mechanisms of ageing and development.* 2003; 124(8): 903-10.

18. Pillai S., Oresajo C., Hayward J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation — a review. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2005; 27(1): 17-34.
19. Tanaka K., Asamitsu K., Uranishi H., Iddamalga A., Ito K., Kojima H., Okamoto T. Protecting skin photoaging by NF- κ B inhibitor. *Current drug metabolism.* 2010; 11(5): 431-35.
20. Tanaka K., Hasegawa J., Asamitsu K., Okamoto T. Prevention of the ultraviolet B-mediated skin photoaging by a nuclear factor κ B inhibitor, parthenolide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2005; 315(2): 624-30.
21. Eming S.A., Martin P., Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci. Transl. Med.* 2014; 6(265): 6. Available at: <http://stm.sciencemag.org/content/6/265/265sr6>
22. Cheng W., Yan-hua R., Fang-gang N., & Guo-an Z. The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury. *African Journal of Biotechnology.* 2013; 10(13): 2524-9.
23. Verrecchia F., Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J. Invest. Dermatol.* 2002; 118(2): 211-5.
24. Fisher G.J., Shao Y., He T., Qin Z., Perry D., Voorhees J.J., Quan T. Reduction of fibroblast size/mechanical force down-regulates TGF- β type II receptor: implications for human skin aging. *Aging Cell.* 2016; 15(1): 67-76.
25. Varani J., Dame M.K., Rittie L., Fligel S.E., Kang S., Fisher G.J., Voorhees J.J. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am. J. Pathol.* 2006; 168(6): 1861-8.
26. Li X., Talts U., Talts J.F., Arman E., Ekblom P., Lonnai P. Akt PKB regulates laminin and collagen IV isotypes of the basement membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98(25): 14416-21.
27. Vazquez F., Palacios S., Aleman N., Guerrero F. Changes of the basement membrane and type IV collagen in human skin during aging. *Maturitas.* 1996; 25(3): 209-15.
28. Takahashi M., Eda A., Fukushima T., Hohjoh H. Reduction of type IV collagen by upregulated miR-29 in normal elderly mouse and klotho-deficient, senescence-model mouse. *PLoS one.* 2012; 7(11): P. e48974.
29. Mehta R. C., Fitzpatrick R. E. Endogenous growth factors as cosmeceuticals. *Dermatologic therapy.* 2007; 20(5): 350-9.
30. Sobolewski K., Malkowski A., Bankowski E., Jaworski S. Wharton's jelly as a reservoir of peptide growth factors. *Placenta.* 2005; Vol.26: 747-52.
31. Van Pham P., Dang L.T., Dinh U.T., Truong H.T., Huynh B.N., Van Le D., Phan N.K. In vitro evaluation of the effects of human umbilical cord extracts on human fibroblasts, keratinocytes, and melanocytes. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2014; 50(4): 321-30.
32. Arno A. I., Amini-Nik S., Blit P.H., Al-Shehab M., Belo C., Herer E., Tien C.H., Jeschke M.G. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling. *Stem cell research & therapy.* 2014; 5(1): 1.
33. Zhang L., Falla T. J. Cosmeceuticals and peptides. *Clinics in dermatology.* 2009; 27(5): 485-94.
34. Yutskovskaya Ya.A., Danilova A.A. The therapy of the skin with hallmarks of chronological aging using Meso-Wharton P199 drug. Clinical case. *Plasticheskaya khirurgiya i kosmetologiya.* 2014; 3: 337-496. (in Russian)
35. Petrikovskiy B. Cell renewal of the skin as a result of peptide regulation of intrinsic stem cells activity. *Esteticheskaya meditsina.* 2012; 2: 283-93. (in Russian)
36. Kozhina K.V., Volkova E.N., Saburina I.N., Morozov S.G., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Grigor'eva A.A. The study of the influence of peptide bioregulators on age-related changes in skin culture models in 3D-format. *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney.* 2016; 19(1): 58-63. (in Russian)
37. Kozhina K.V., Volkova E.N., Saburina I.N., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Gorkun A.A. Skin rejuvenation in 3D format. *In "ekstionnye metody v kosmetologii.* 2015; (4): 40-7. (in Russian)
38. Kozhina K.V., Saburina I.N., Gorkun A.A., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Volkova E.N., Morozov S.G. Comparative study of p199 effect on 2D and 3D cultures of human dermal fibroblasts. *Patogenez.* 2015; 435-41. (in Russian)

Сведения об авторах:

Кожина Кристина Витальевна, науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП, врач дерматолог-косметолог, сертифицированный тренер ООО «Премьер-Фарм»

Зурина Ирина Михайловна, мл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП

Коселева Настасья Владимировна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП

Сабурина Ирина Николаевна, доктор биол. наук, проф. каф. общей патологии и патофизиологии, зав. лабораторией клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616.831-005.1:616-092.9

Воронков А.В., Мамлеев А.В.

Взаимосвязь развития эндотелиальной дисфункции и активности протеинкиназы C при ишемическом повреждении головного мозга

Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, 357532, Ставропольский край, г.Пятигорск, пр. Калинина, д. 11

Ишемический инсульт — причина высокой смертности и инвалидизации населения во всем мире, тесно связан с дисфункцией эндотелия (ЭД). Регуляцию специфических функций эндотелия осуществляет, в основном, универсальный модулятор — оксид азота. В выработке оксида азота участвует ряд ферментов, но специфическим для эндотелия является эндотелиальная NO-синтаза (eNOS), нарушение регуляции которой наблюдается при ишемическом инсульте. Значительную роль в регуляции активности eNOS отводят протеинкиназе C (ПКС). В обзоре рассмотрены следующие процессы: взаимосвязь ЭД и оксида азота при ишемическом инсульте; особенности биологической активности оксида азота в зависимости от места синтеза и времени ишемического повреждения; регуляция активности eNOS с помощью ПКС; взаимосвязь между ЭД и активностью ПКС при оксидативном стрессе; основные сигнальные пути, включающие активацию eNOS и ПКС. Отмечено, что при развитии ЭД наблюдается повышенная активность ПКС, обсуждается перспективность поиска веществ с ингибирующим влиянием на активность ПКС для лечения большого числа сердечно-сосудистых заболеваний и ишемического инсульта в частности.

Ключевые слова: сердечно-сосудистые патологии, эндотелиальная функция, эндотелиальная дисфункция, эндотелиальная NO-синтаза, нейрональная NO-синтаза, индуцибельная NO-синтаза, оксид азота, эндотелиопротекторные препараты, ишемия головного мозга, протеинкиназа C, оксидативный стресс, вазодилатация, церебральный вазоспазм, микрососудистая проницаемость.

Для корреспонденции: Мамлеев Андрей Викторович, очный аспирант каф. фармакологии с курсом клинической фармакологии, преподаватель, e-mail: mamaev.ma00@mail.ru

Для цитирования: Воронков А.В., Мамлеев А.В. Взаимосвязь развития эндотелиальной дисфункции и активности протеинкиназы C при ишемическом повреждении головного мозга. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 134–142.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.02.2016

Voronkov A.V., Mamleev A.V.

Endothelial dysfunction and Protein kinase C activity development interrelation at ischemic injury of a brain

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute — branch Medical University VolGGMU Russian Ministry of Health, Russia, 357532, Pyatigorsk, Kalinina Prospect, 11

The ischemic stroke is the reason of high mortality and population disability worldwide and it is closely connected with endothelium dysfunction (ED). The endothelium carries out regulation of specific functions, generally the universal modulator — nitrogen oxide. A number of enzymes participates in a production of nitric oxide, but specific for an endothelium is endothelial NO synthase (eNOS), which violation of regulation is observed at an ischemic stroke. Significant role in activity of eNOS regulation plays protein kinase C (PKC). In this review the following processes were investigated: ED and nitric oxide interrelation at an ischemic stroke; some features of biological activity of nitric oxide depending on a place of synthesis and on time of ischemic damage; eNOS activity regulation by means of PKC; interrelation between ED and PKC activity at oxidative stress; the main alarm ways including activation of eNOS and PKC which regulate microvascular permeability and a tone of vessels of a brain. Being guided by the carried-out analysis of theoretical data, it should be noted that at development of ED the PKC hyperactivity is observed, therefore, the search of the substances possessing inhibiting influence on activity of PKC for treatment of the majority of cardiovascular diseases and an ischemic stroke has become particularly important and perspective.

Keywords: cardiovascular pathologies, endothelial function, endothelial dysfunction, endothelial NO-synthase, neuronal NO-synthase, inducible NO-synthase, nitrogen oxide, endothelioprotective preparations, brain ischemia, protein kinase C,

an oxidative stress, vasodilatation, cerebral vasospasm, microvascular permeability.

For correspondence: Mамлеев Андрей Викторович, e-mail: mamaev.ma00@mail.ru

For citation: Voronkov A.V., Mамлеев A.V. Endothelial dysfunction and Protein kinase C activity development interrelation at ischemic injury of a brain. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (4): 134–142. (in Russ.).

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

Funding. The study had no sponsorship.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Information about authors:

Voronkov Andrey Vladislavovich — orcid.org/0000-0001-6638-6223

Mамлеев Андрей — orcid.org/0000-0001-9657-2246

Received 20.02.2016

Введение

Ишемический инсульт — причина высокой смертности и инвалидизации населения во всем мире, тесно связан с дисфункцией эндотелия, которая является ранним признаком и неблагоприятным прогностическим фактором постишемических и сердечно-сосудистых осложнений. В поиске терапевтических путей коррекции инсульта эндотелий сосудов можно рассматривать, как самостоятельную мишень терапевтического воздействия.

В регуляции специфических функций эндотелия: противовоспалительной, вазодилатационной, антитромботической и антипролиферативной участвует универсальный модулятор — эндогенный оксид азота. Ключевую роль в выработке оксида азота выполняет эндотелиальная NO-синтаза, нарушение регуляции которой можно наблюдать при многих патологических состояниях, в том числе и при ишемическом инсульте. Учитывая значительную роль в регуляции активности NOS протеинкиназы C, можно предположить, что фармакологическое воздействие на этот вид ферментов так же представляет собой научно-практический интерес.

Установлено, что активация протеинкиназы C может нарушать функцию эндотелия при ишемическом инсульте, вызывая как неспецифическое повреждение путем усиления свободнорадикальных процессов в эндотелиальных клетках, так и специфическое ингибирование активности eNOS за счет процессов фосфорилирования и дефосфорилирования, нарушения процессов транскрипции.

1. Эндотелиальная дисфункция при ишемии головного мозга. Роль оксида азота

Эндотелиальные клетки, расположенные на базальной мембране, обладают аутокринной, паракринной и эндокринной функцией, способствуют поддержанию баланса между процессами, участвующими в вазомоторных реакциях, пролиферации клеток, тромбообразованию и воспалению [1, 2].

Многие патогенетические факторы, в том числе оксидативный стресс [3, 4], могут нарушить работу эндотелия, сдвигая его основные функции в сторону вазоконстрикции, усиления процессов тромбообразования, воспаления, пролиферации и вызывая тем самым его дисфункцию.

Универсальным модулятором основных функций эндотелия является оксид азота, биологическая активность которого [5, 6] зависит от места его образования и от ферментов его синтезирующих [7, 8]. На сегодняшний день выделяют конститивные изоформы, т.е. изоформы NOS, которые постоянно продуцируют относительно небольшое количество оксида азота, их активность зависит от уровня кальция в клетке. В зависимости от тканей, в которых находятся конститивные изоформы NO-синтаз, выделяют эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS, которая отвечает за специфическую эндотелиопротекторную функцию) и нейрональную NOS (nNOS — нейроны коры больших полушарий (2%), в глутаматергических зернистых клетках, ГАМК-ергических корзинчатых клетках мозжечка, полосатом теле) [9]. Третья изоформа называется индуцибельной (iNOS), она широко распространена в макрофагах, астроцитах, микроглиальных клетках и ее активность не зависит от уровня кальция в цитоплазме. При активации индуцибельной синтазы образуется большое количество оксида азота, который может повреждать нейронные системы [10].

Механизм повреждающего действия оксида азота нервных клеток при ишемии головного мозга связывают с активацией глутаматных рецепторов. Вероятно, это происходит следующим образом: возбуждающие аминокислоты в синаптической щели вызывают гиперактивацию глутаматных NMDA-рецепторов, что способствует открытию Na^+ - и Ca^{2+} -каналов с последующим увеличением потока кальция в нервную клетку. Последний связывается с кальмодулином, который активирует NOS, катализирующую образование NO. В свою очередь, NO стимулирует гуанилатциклазу с дальнейшим синтезом цГМФ, запускающего различные внутрикле-

точные метаболические процессы. Кроме того, оксид азота при взаимодействии с супероксидом может образовывать токсичный вторичный радикал — пероксинитрит [8—10].

В патофизиологических механизмах нарушения мозгового кровообращения принимают участие все три изоформы — pNOS, eNOS и iNOS. Стоит отметить, что данные об изменениях активности изоферментов NOS, а, следовательно, и содержания NO в церебральных структурах во время ишемии достаточно противоречивы [8—10]. На начальных этапах ишемии, при окклюзии средней мозговой артерии продолжительностью 30 мин наблюдается повышение уровня оксида азота в 20 раз [11, 12]. Вероятнее всего это происходит за счет кальций-зависимого механизма и более выраженной активации pNOS, по сравнению с eNOS. Затем на протяжении 7 сут. наблюдается снижение активности pNOS и eNOS в тканях с пропорциональным уменьшением количества оксида азота [11, 12]. В отличие от своих конститутивных изоформ iNOS активируется начиная с 12 ч до 7 сут. [14]. Таким образом, можно говорить о цикличности и фазности изменения активности изоформ и уровней оксида азота в ишемизированном мозге.

Помимо изменения уровней оксида азота, высвобождение NO при острой церебральной ишемии может оказывать как отрицательное, так и положительное влияние на исход гипоксического воздействия. Так, повышение активности eNOS приводит к нейропротективному эффекту, вероятно, за счет церебральной вазодилатации, действию NO, ингибированию агрегации тромбоцитов и адгезии эндотелиальных лейкоцитов [8—10, 15]. Кроме того, эндотелиальная NOS участвует в ремоделировании сосудов и ангиогенезе [16, 17]. Согласно данным некоторых авторов [18] эндотелиальная NOS может также стимулировать нейрогенез.

С другой стороны, оксид азота, синтезируемый нейрональной синтазой, негативно влияет на выживаемость клеток и неврологический статус [19—21]. Также отсроченная активация индуцибельной синтазы, усугубляет течение ишемического повреждения [8, 22]. Токсичность оксида азота, синтезируемого в большом количестве iNOS, может быть следствием образования дисульфидов цистеина и глутатиона [23], формирования нитрозотиолов или нитрозилирования белков [24]. Негативное влияние может быть также обусловлено повышенным образованием свободнорадикальных продуктов; в комбинации с супероксидными радикалами NO образует токсический пероксинитрит, способствующий повреждению клеточных мембран, липидов, белка, ДНК и в целом клеток, что приводит к нейродегенеративным повреждениям [8]. Существенно также, что оксид азота может запускать непосредственно или через пероксинитрит запрограммированную клеточную гибель — апоптоз [20, 25].

Несмотря на то, что есть данные о нейротоксическом действии оксида азота, производимого индуцибельной синтазой в острой фазе инсульта, некоторые исследователи считают, что индуцибельный оксид азота повышает нейрогенез после ишемического воздействия в 1-е и 3-и сут. [26]. Роль индуцибельного оксида азота в восстановлении нервной ткани подтверждается с помощью применения ингибитора индуцибельной синтазы — аминогуанидина, приводящего к уменьшению постишемического нейрогенеза [27]. Нейрональная синтаза оксида азота, напротив, снижает интенсивность репарации нервных клеток на всех этапах ишемии [28—30]. Вероятно, имеется следующая взаимосвязь — при повышении активности iNOS уменьшается активность pNOS, и наоборот [30].

Также имеются данные, что оксид азота, синтезируемый индуцибельной NOS является ключевым фактором в процессах ишемического прекодиционирования [31, 32].

Таким образом, можно резюмировать следующие возможные подходы к терапевтической коррекции ишемического инсульта:

1) на начальных этапах ишемического повреждения целесообразно увеличивать активность eNOS, и, теоретически, iNOS;

2) на более поздних этапах ишемии и/или реперфузии, когда наблюдается выраженная активация iNOS, усугубляющая повреждение клеток, ее активность необходимо ограничивать;

3) нейрональную синтазу терапевтически выгодно блокировать как при острой, так и при хронической ишемии, а активность eNOS — повышать.

Учитывая универсальную и значительную роль eNOS в коррекции патологических процессов ишемического повреждения целесообразно рассмотреть механизмы ее регуляции. Регуляция всех изоферментов NOS может осуществляться многими внутриклеточными процессами, в том числе большую роль отводят процессам фосфорилирования/дефосфорилирования с помощью ряда протеинкиназ.

Фосфорилирование eNOS по-разному влияет на течение патологических процессов, в том числе при ишемическом инсульте, при котором активность eNOS снижена [33, 34].

По некоторым данным [33], фосфорилирование аминокислоты серина оксигеназного центра S116, фосфорилирование кальмодулинового тропина — T495 и дефосфорилирование редуцтазного серина — S1177 приводит к снижению активности eNOS, что является фактором дисфункции эндотелия. Повышение фосфорилирования кальмодулинового T495 и дефосфорилирования редуцтазного S1177 центров лежит в основе патогенетического процесса при ишемии головного мозга [33].

2. Эндотелиальная дисфункция и активность ПКС

Одним из перспективных направлений коррекции эндотелиальной функции следует рассматривать регуляцию eNOS с помощью протеинкиназа С (ПКС). ПКС усиливает фосфорилирование кальмодулинового T495 и дефосфолирование редуктазного S1177. Ингибирование ПКС приводит к увеличению активности eNOS [33, 35].

Данные о роли оксидативного стресса и ПКС в повреждении эндотелия приводят многие исследования [36—39]. Активация ПКС при ишемии/реперфузии может осуществляться как рецепторным, так и безрецепторными механизмами [40, 41].

Активация ПКС безрецепторным механизмом осуществляется с помощью активных форм кислорода (АФК). Один из механизмов связан с прямой модификацией АФК регуляторного домена ПКС, в результате чего увеличивается активность ПКС, зависящая от концентрации кальция и фосфолипидов. Второй механизм связан с повышением активности таких ферментов, как фосфолипаза С, фосфолипаза D и фосфолипаза A2, что приводит к увеличению содержания мощных активаторов ПКС (ИФ3, ДАГ, жирные кислоты, кальций). Третий механизм связан с увеличением фосфорилирования ПКС по остаткам Туг-512 и Туг-523. Возможно, это связано с активацией белков Src, относящихся к семейству белковых тирозинкиназ, которые представлены в различных клетках, не только в эндотелиальных [36].

Установлено, что основным окислителем является супероксидный радикал, а не перекись водорода и/или гидроксидный радикал. Это объясняется тем, что только супероксиддисмутаза (СОД), субстратом которой является супероксидный радикал, приводит к улучшению функции эндотелия (ЭФ). СОД защищает эндотелий за счет уменьшения образования супероксидного радикала и продуктов его конденсации, таких как пероксинитрит. Одним из возможных эндотелиопротекторных механизмов ингибирования ПКС (ингибитор хелеритрин) является уменьшение содержания супероксидного радикала, и, связанную с ним, утилизацию оксида азота [39].

Продолжая рассматривать связь оксидативного стресса с активностью ПКС нужно отметить, что СОД лишь частично защищает и восстанавливает эндотелиальную функцию, следовательно, есть и другие механизмы, опосредованные ПКС, в развитии ЭД после ишемической атаки [39].

Активация ПКС может осуществляться и рецептор-опосредованным механизмом. Доказана роль рецепторов эндотелина в постишемическом повреждении эндотелия, при блокаде которых (с помощью босентана) снижается количество свободных радикалов аналогично действию хелеритрина. Блокада рецепто-

ров эндотелина уменьшает в некоторой степени активность ПКС и связанную с ней повышенную продукцию свободных радикалов [42—44].

Таким образом, исходя из вышесказанного, наблюдается следующая последовательность событий, наблюдаемых при ЭД, вызванной ишемией: ишемия/реперфузия, активация ПКС как спонтанным (безрецепторным), так рецептор-опосредованным механизмом, увеличение продукции токсических свободных радикалов посредством ПКС, активация ПКС свободными радикалами и АФК и так далее.

Подобный патогенетический механизм представляет собой «порочный круг» активации ПКС, наблюдаемый при ЭД, который возможно прервать с помощью ингибиторов ПКС.

3. Взаимосвязь ПКС и eNOS в регуляции микрососудистой проницаемости

Одним из показателей нарушения функций эндотелия является нарушение проницаемости. На сегодняшний день рассматриваются различные внутриклеточные пути передачи информации, которые регулируют барьерную функцию эндотелия, и значительное количество данных свидетельствует о ключевой роли кальция, оксида азота и ПКС в этих процессах [45—47].

Рассматривают [45] 2 различных механизма регуляции микрососудистой проницаемости (рис. 1).

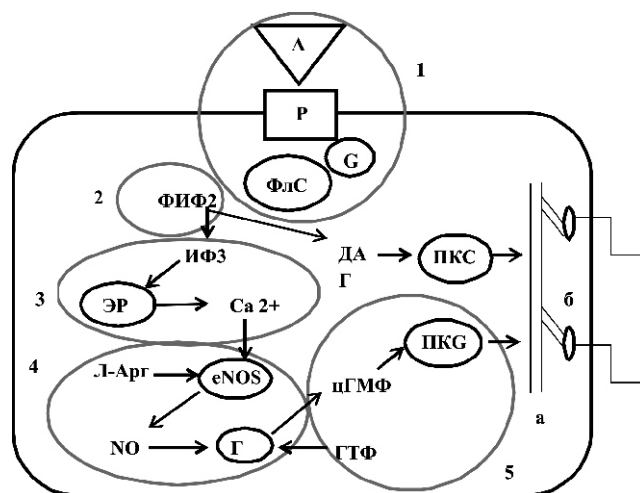


Рис. 1. Возможные пути регуляции сосудистой проницаемости. 1, 2, 3, 4, 5 — стадии; А — агонист рецепторов; Р — рецептор; G — G-белок; ФЛС — фосфолипаза С; ФИФ2 — фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат; ИФ3 — инозитол-1,4,5-три фосфат; Ca²⁺ — ионы кальция; eNOS — эндотелиальная NO-синтаза; Л-Арг — L-аргинин; NO — оксид азота; ГЦ — гуанилатциклаза; ЭР — эндоплазматический ретикулум; ДАГ — диацилглицерол; ГТФ — гуанозинтрифосфат; цГМФ — циклический гуанозинмонофосфат; ПКС — протеинкиназа С; ПКГ — протеинкиназа G; а — цитозольные/актиновые микрофиламенты; б — белки сцепления; в — якорные (линкерные гликопротеиды).

Первый связан с активацией eNOS с помощью ионов кальция, что приводит к запуску механизма eNOS-NO-цГМФ-ПКС, играющего главную роль в увеличении транспорта воды и макромолекул через сосудистый эндотелий. Второй механизм включает активацию ПКС.

Начальные этапы активации обоих механизмов схожи и происходят в эндотелиальных клетках. Они начинаются с активации рецепторов (1 стадия) (например гистамина), связанных с G-белком. G-белок активирует фермент фосфолипазу C (ФЛС), которая (стадия 2) гидролизует фосфатидинозитол-4,5-дифосфат (ФИФ2) в результате чего образуется инозитол-1,4,5-три фосфат (ИФ3) и второе соединение — диацилглицерол (ДАГ). Далее пути регуляции сосудистой проницаемости расходятся. Для активирования механизма с участием eNOS в главной роли происходит следующий биохимический каскад: ИФ3 (стадия 3) мобилизует кальций из эндоплазматического ретикулума (ЭР), который, в свою очередь, является мощным активатором eNOS; затем eNOS (стадия 4) катализирует реакцию превращения л-аргинина в оксид азота (NO), последний в свою очередь повышает активность гуанилатциклазы (ГЦ); гуанилатциклаза (стадия 5) метаболизирует гуанозинтрифосфат (ГТФ) до циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), который активирует протеинкиназу G (ПКГ). ПКГ изменяет структуру белков эндотелиального цитоскелета, молекул межклеточных контактов и контактов клетка—межклеточное вещество.

Активация механизма, связанного с ПКС, начинается так же, как и в случае с системой eNOS-NO-гуанилатциклаза-цГМФ-ПКС, но ДАГ, который образуется на второй стадии, приводит к повышению активности ПКС. ПКС может регулировать проницаемость сосудистой стенки, воздействуя прямо на структурные эндотелиальные белки, или косвенно, путем модификации eNOS. Пути ПКС и ПКГ выполняют одинаковую роль в проницаемости микрососудов.

Известно, что активация пути, опосредованного через ПКС (активация без кальция характерна не для всех подтипов ПКС [35,51]), не требует повышения уровня кальция. Механизм eNOS-NO-гуанилатциклаза-цГМФ-ПКС связан с быстрым увеличением концентрации кальция, в отличие от системы ПКС [45].

Не все исследователи разделяют точку зрения, что активация ПКС ведет к повышению проницаемости сосудистой стенки [47—49]. Возможно, это связано с различной активностью отдельных изоформ ПКС и с использованием активаторов и ингибиторов ПКС разной специфичности.

Установлено [45], что ингибирование eNOS уменьшает сосудистую проницаемость, индуцированную активатором ПКС — ФМА, но частично, поэтому предполагается частичное влияние ПКС на продукцию оксида азота и регуляцию сосудистой проницаемости, а также наличие механизма, влияющего на проницаемость не связанного с высвобождением оксида азота.

При ЭД наблюдается повышенная активность ПКС, увеличение проницаемости и снижение активности eNOS [50]. Возможно, повышенная активация ПКС приводит к увеличению проницаемости, снижению активности eNOS. Считается, что терапевтически лучше ингибировать активность ПКС, но эта точка зрения требует дальнейших исследований.

4. ПКС и церебральный вазоспазм

Повышенный тонус мозговых сосудов может наблюдаться при разных патологических состояниях — при нарушении мозгового кровообращения, ишемическом и гемморрагическом инсультах. Выделяют два возможных механизма развития церебрального вазоспазма [51]. На первых этапах преобладает классический механизм мышечного сокращения, суть которого сводится к повышению фосфорилирования легких цепей миозина (ЛЦМ) с помощью киназы легких цепей миозина (КЛЦМ), активность которой в значительной степени зависит от концентрации ионов кальция. Однако при уменьшении фосфорилирования легких цепей миозина с помощью киназы и при снижении уровня кальция наблюдается поддержание вазоспазма. Поэтому рассматривают другой механизм спазма сосудов, который участвует в отсроченном и длительном вазоспазме, и значительную роль в этом процессе этом отводят ПКС [51—54].

В миоцитах гладких мышц основная роль ПКС состоит в повышении чувствительности микрофиламентов к ионам кальция, что приводит к вазоконстрикции [53]. Кроме того, ПКС фосфорилирует потенциал-зависимые кальциевые каналы, ингибируют калиевые, связывает многие другие внутриклеточные сигнальные пути включающие киназу легких цепей миозина, систему оксида азота, систему внутриклеточного кальциевого депо, тирозинкиназу и ее субстраты, такие, как митогенактивируемая протеинкиназа (МАПК) и т.д. Таким образом, ПКС имеет мультифакторный спектр влияния на многие процессы, в том числе процессы, приводящие к церебральному вазоспазму [51, 52, 54].

В связи с этим необходимо рассмотреть механизм активации ПКС в гладкомышечных клетках (ГМК) сосудов. Процесс активации ПКС в ГМК аналогичен таковому в эндотелиальных и включает следующую последовательность: рецептор, связанный

с G-белком — Фосфолипаза C — ФИФ2 — ДАГ — ПКС. Тем более доказана центральная роль фосфолипазы C, ДАГ и ПКС в повышенной чувствительности миофиламентов к кальцию именно в поддержании тонуса мозговых сосудов ПКС [51]. Повышенный тонус мозговых сосудов обусловлен активацией ПКС в большей степени, чем коронарных, брыжеечных и бедренных артериях [55].

После активации ПКС и перемещению ее к мембране происходит фосфорилирование белков. Процесс усиления фосфорилирования легких цепей миозина (ЛЦМ20) и увеличения кальция быстро затухает, а длительное сокращение поддерживается благодаря фосфорилированию кальдесмона, десмина и др., увеличению уровня фосфатаз (1 и 2а), также приводящие к увеличению фосфорилирования кальдесмона, десмина,

кальпаина, киназы ЛЦМ. Все эти процессы приводят к сенсбилизации сократительных элементов к ионам кальция [51, 54]. К аналогичным данным приводят исследования с использованием активатора ПКС — ФМА. Ключевую роль выполняет Rho-киназа, которая ингибирует фосфатазу легких цепей миозина, в результате чего не происходит дефосфорилирования миозина, что опять же приводит к мышечному сокращению [56, 57]. Кроме того Rho-киназа повышает экспрессию пре-проэндотелина, способствуя тем самым развитию ряда сосудистых заболеваний [58, 59].

Помимо этих механизмов поддержания сосудистого тонуса активация ПКС приводит к ингибированию Ca^{2+} -зависимых- K^{+} каналов, что удлиняет потенциал действия, а, следовательно, и время сокращения [60].

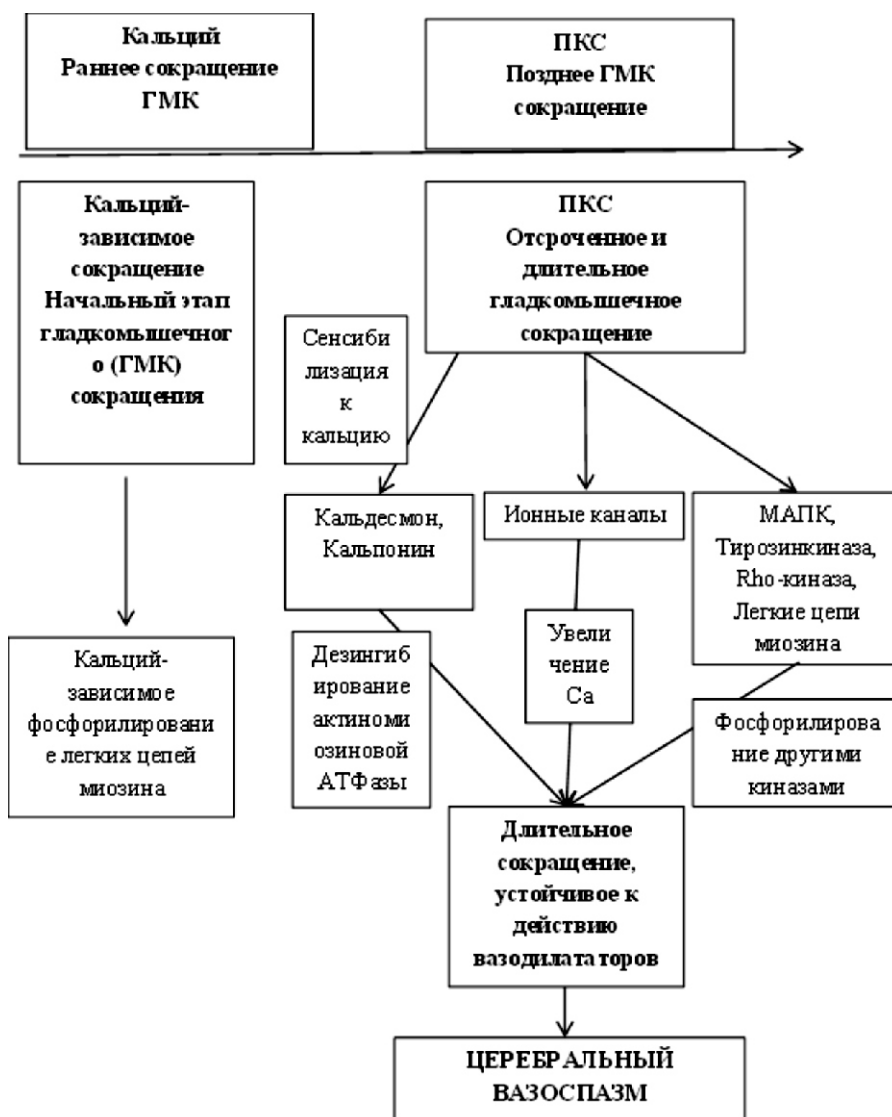


Рис. 2. Схема основных механизмов развития церебрального вазоспазма.

Предполагают также, что ПКС играет ключевую роль в качестве фактора, связывающего несколько других сигнальных путей с участием кальмодулина, киназы легких цепей миозина, оксида азота, внутриклеточного кальция, тирозинкиназы и ее субстратов, таких, как митогенактивируемая протеинкиназа (МАПК) [51, 54, 61], что в сумме поддерживает длительное сужение просвета сосудов.

Рассматривая повышенный тонус мозговых сосудов и ЭД, необходимо отметить роль оксида азота.

Спазм сосудов может быть вызван дисбалансом между факторами релаксации (простаглицлин и др. эйкозаноиды, оксид азота) и констрикции (эндотелин). Последний действует через ПКС, а ПКС регулирует его выработку [41, 44, 54, 62]. Оксид азота — основной фактор релаксации — увеличивает цГМФ в цитозоле, который приводит к расслаблению сосудов и противостоит сократительным агентам, в том числе эндотелину [59]. Системы оксида азота-цГМФ и ПКС задействованы в патогенезе церебрального вазоспазма, и считается, что система оксид азота-цГМФ выполняет отрицательную обратную связь, т.е. уменьшает вазоконстрикцию, вызванную сократительными факторами, в том числе, вызванную активностью ПКС. Субарахноидальное кровоизлияние (САК) нарушает механизм отрицательной обратной связи, что приводит к ЭД, следовательно длительной вазоконстрикции [54].

Исследования показали, что если развился спазм сосудов головного мозга, то донаторы оксида азота не в состоянии вернуть тонус сосудов в физиологическое состояние. Вазоспазм, вызванный с помощью активатора ПКС — форболового эфира, не регулируется цАМФ, при этом донаторы оксида азота не приводят к активации NO-гуанилатциклаза-цГМФ-ПКГ, тогда как аналог цГМФ приводил к ослаблению тонуса сосудов [51].

Таким образом, в церебральном вазоспазме играют роль как кальций-зависимые так и кальций-независимые механизмы (рис. 2) [51], с учетом этого можно предположить, что блокируя деятельность ПКС, возможно уменьшить вазоспазм мозговых сосудов, к развитию которого привели различные механизмы.

Заключение

Рассмотрев взаимосвязь активности ПКС с развитием ЭД через ряд таких патофизиологических процессов, как оксидативный стресс, микрососудистая проницаемость, сосудистый вазоспазм, нельзя не отметить большую общебиологическую роль активности ПКС и, следовательно, весьма перспективным становится поиск веществ обладающих ингибирующим влиянием на активность ПКС для лечения большинства сердечно-сосудистых заболеваний и ишемического инсульта в частности.

References

1. Treshchinskaya M.A. Teoreticheskie i prakticheskie aspekty primeneniya L-arginina s cel'yu profilaktiki cerebrovaskulyarnoj patologii. *Ukrainskij medicinskij zhurnal*. 2011; 5: 97. (in Russian)
2. Perez-Vizcaino F., Duarte J., Andriantsitohaina R. Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic. Res.* 2006; 40: 1054-65.
3. Эндотелиопротекторы — новый класс фармакологических препаратов / I.N. Tyurenkov, A.V. Voronkov, A.A. Sliechanski dr. *Vestnik RAMN*. 2012; 7: 54-7. (in Russian)
4. Markov Kh.M. Oksidativny`i` stress i disfunktsiia e`ndoteliia. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2005; Vol. 4: P. 5-9.
5. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide / L.J. Ignarro, G.M. Buga, K.S. Wood et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987; Vol. 84: P. 9265-9.
6. Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; Vol. 327: P. 524-6.
7. Bauer V, Sotnikova R. Nitric oxide—the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions. *Gen. Physiol. Biophys.* 2010; 29(4): 319-40.
8. Nechipurenko N.I. Rol' oksida azota pri ishemii golovnogo mozga. *Medicinskie novosti*. 2004; 1: 7-10. (in Russian)
9. Nechipurenko N.I., Pashkovskaya I.D., Musienko Yu.I. Osnovnye patofiziologicheskie mekhanizmy ishemii golovnogo mozga. *Medicinskie novosti*. 2008; 1: 7-13.
10. Terpolilli N.A., Moskowitz M.A., Plesnila N. Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. *Cereb. Blood Flow Metab.* 2012; 32(7): 1332-46.
11. Mohammadi M.T., Shid-Moosavi S.M., Dehghani G.A. Contribution of nitric oxide synthase (NOS) in blood-brain barrier disruption during acute focal cerebral ischemia in normal rat. *Pathophysiology*. 2012; 19(1): 13-20.
12. Possible involvement of NO/NOS signaling in hippocampal amyloid-beta production induced by transient focal-cerebral ischemia in aged rats / S. Li, W. Wang, C. Wang et al. *Neurosci. Lett.* 2010; 470(2): 106-10.
13. Damage to neurons and oligodendrocytes in the hippocampal CA1 sector after transient focal ischemia in rats / H. Uchida, Y. Fujita, M. Matsueda et al. *Cell Mol. Neurobiol.* 2010; 30(7): 1125-34.
14. Time course of expression of three nitric oxide synthase isoforms after transient middle cerebral artery occlusion in rats / M. Niwa, S. Inao, M. Takayasu et al. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. 2001; Vol. 41: P. 63-72.
15. Targeting eNOS for stroke protection / M. Endres, U. Laufs, J.K. Liao et al. *Trends Neurosci.* 2004; 27(5): 283-9.
16. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin / T. Murohara, J.R. Horowitz, M. Silver et al. *Circulation*. 1998; Vol. 97: P. 99-107.
17. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells / A. Aicher, C. Heeschen, C. Mildner-Rihm et al. *Nat. Med.* 2003; 9(11): 1370-6.
18. Differential effect of endothelial nitric oxide synthase (NOS-III) on the regulation of adult neurogenesis and behavior / A. Reif, A. Schmitt, S. Fritzen et al. *Eur. J. Neurosci.* 2004; Vol. 20: P. 885-95.

19. Ghrelin suppresses inflammation and neuronal nitric oxide synthase in focal cerebral ischemia via the vagus nerve / C. Cheyuo, R. Wu, M. Zhou et al. *Shock*. 2011; 35(3): 258-65.
20. Influence of duration of focal cerebral ischemia and neuronal nitric oxide synthase on translocation of apoptosis-inducing factor to the nucleus / X. Li, M. Nemoto, Z. Xu et al. *Neuroscience*. 2007; Vol. 144(1): 56-65.
21. Inducible nitric oxide synthase appears and is co-expressed with the neuronal isoform in interneurons of the rat hippocampus after transient ischemia induced by middle cerebral artery occlusion / L. Corsani, E. Bizzoco, F. Pedata et al. *Exp. Neurol*. 2008; 211(2): 433-40.
22. Zhao X., Ross M.E., Iadecola C. L-Arginine increases ischemic injury in wild-type mice but not in iNOS deficient mice. *Brain Res*. 2003; Vol. 966: P.308-11.
23. Cohen R.A., Adachi T. Nitric-oxide-induced vasodilatation: regulation by physiologic s-glutathiolation and pathologic oxidation of the sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase. *Trends Cardiovasc. Med*. 2006; Vol. 16: P. 109-14.
24. Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor / K. Matsushita, C.N. Morrell, B. Cambien et al. *Cell*. 2003; Vol. 115: P. 139-50.
25. The critical role of calpain versus caspase activation in excitotoxic injury induced by nitric oxide / C. Volbracht, B.T. Chua, C.P. Ng et al. *J. Neurochem*. 2005; 93(5): 1280-92.
26. Distribution of inducible nitric oxide synthase and cell proliferation in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion / Y. Sehara, T. Hayashi, K. Deguchi et al. *Brain Res*. 2006; Vol. 1093: P. 190-7.
27. Expression of inducible nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult rodent dentate gyrus / D.Y. Zhu, S.H. Liu, H.S. Sun et al. *J. Neurosci*. 2003; Vol. 23: P. 223-9.
28. Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis / M.A. Packer, Y. Stasiv, A. Benraiss et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; Vol. 100: P. 9566-71.
29. Nitric oxide is a physiological inhibitor of neurogenesis in the adult mouse subventricular zone and olfactory bulb / B. Moreno-Lopez, C. Romero-Grimaldi, J. A. Noval et al. *J. Neurosci*. 2004; Vol. 24: P. 85-95.
30. Reduced neuronal nitric oxide synthase is involved in ischemia-induced hippocampal neurogenesis by upregulating inducible nitric oxide synthase expression / C.X. Luo, X.J. Zhu, Q.G. Zhou et al. *J. Neurochem*. 2007; Vol. 103: P. 1872-82.
31. Inducible nitric-oxide synthase is an important contributor to prolonged protective effects of ischemic preconditioning in the mouse kidney / K.M. Park, J.Y. Byun, C. Kramers et al. *J. BiolChem*. 2003; Vol. 278: P. 27256-66.
32. Obligatory role of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning / S. Cho, E. M. Park, P. Zhou et al. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2005; Vol. 25: P. 493-501
33. Kolluru G.K., Siamwala J.H., Chatterjee S. eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochimie*. 2010; Vol. 92. P. 1186-98.
34. Modification of endothelial no synthase through protein phosphorylation after forebrain cerebral ischemia/reperfusion / K. Osuka, Y. Watanabe, N. Usuda et al. *Stroke*. 2004; Vol. 35: P. 2582.
35. Voronkov A.V., Glushko A.A. Novaya matematicheskaya model' dlya prognozirovaniya ehndotelioprotektoinoj aktivnosti veshchestv na osnove molekulyarnogo dokinga. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2013; 3: 42-7.
36. Lum H., Roebuck K.A. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2001; Vol. 280. P. 719-41.
37. Fisher M. Injuries to the vascular endothelium: vascular wall and endothelial dysfunction. *Rev. Neurol. Dis*. 2008; Vol. 5. Suppl. 1: P. 4-11.
38. Oxidative stress in diabetes-induced endothelial dysfunction involvement of nitric oxide and protein kinase C / F. Pricci, G. Leto, L. Amadio et al. *Free Radic. Biol. Med*. 2003; 35(6): 683-94.
39. Maczewski M., Beresewicz A. The Role of Endothelin, Protein Kinase C and Free Radicals in the Mechanism of the Post-ischemic Endothelial Dysfunction in Guinea-pig Hearts. *J Molecular and Cellular Cardiology*. 2000; Vol. 32: P. 297-310.
40. Seal J. B., Gewertz B. L. Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann. Vasc. Surg*. 2005; Vol. 19(4). P. 572-84.
41. Fisher M. Injuries to the vascular endothelium: vascular wall and endothelial dysfunction. *Rev. Neurol. Dis*. 2008; Vol. 5 Suppl. 1. — P. 4-11.
42. Nitric oxide mediates protective effect of endothelin receptor antagonism during myocardial ischemia and reperfusion / A. T. Gonon, D. Erbas, A. Broijersens et al. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2004; 286(5): 1767-74.
43. Cardioprotective effect of an endothelin receptor antagonist during ischaemia/reperfusion in the severely atherosclerotic mouse heart / A. T. Gonon, A. Bulhak, A. Broijersens et al. *Br. J. Pharmacol*. 2005; 144(6): 860-6.
44. Coucha M., Li W., Ergul A. The effect of endothelin receptor A antagonism on basilar artery endothelium-dependent relaxation after ischemic stroke. *Life Sci*. 2012; 91(13-14): 676-80.
45. Huang Q., Yuan Y. Interaction of PKC and NOS in signal transduction of microvascular hyperpermeability. *Am. J. Physiol*. 1997; Vol. 273(Heart Circ. Physiol. 42). P. 2442-51.
46. Yuan S.Y. Protein kinase signaling in the modulation of microvascular permeability. *Vascul. Pharmacol*. 2002; 39(4-5): 213-23.
47. Divergence of Angiogenic and Vascular Permeability Signaling by VEGF Inhibition of Protein Kinase C Suppresses VEGF-Induced Angiogenesis, but Promotes VEGF-Induced, NO-Dependent Vascular Permeability / I. Spyridopoulos, C. Luedemann, D. Chen et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2002; Vol. 22: P. 901-6.
48. Phosphorylation of Thr495 regulates Ca/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity / I. Fleming, B. Fisslthaler, S. Dimmeler et al. *Circ Res*. 2001; Vol. 88: P. 68-75.
49. Simultaneous activation of several second messengers in hypoxia-induced hyperpermeability of brain derived endothelial cells / S. Fischer, M. Wiesnet, H. H. Marti et al. *Cell Physiol*. 2004; 198(3): 359-69.
50. Dang L., Seale J.P., Qu X. High glucose-induced human umbilical vein endothelial cell hyperpermeability is dependent on protein kinase C activation and independent of the Ca²⁺-nitric oxide signalling pathway. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 2005; 32(9): 771-6.
51. Laher I., Zhang J.H. Protein Kinase C and Cerebral Vasospasm. *J. Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2001; Vol. 21: P. 887-906.

52. Tani E., Matsumoto T. Continuous elevation of intracellular Ca^{2+} is essential for the development of cerebral vasospasm. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2004; 2(1): 13-21.
53. Walsh M.P., Cole W.C. The role of actin filament dynamics in the myogenic response of cerebral resistance arteries. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2013; 33(1): 1-12.
54. Nishizawa S. Roles of signal transduction mechanisms in cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: overview. *Acta. Neurochir. Suppl.* 2011; 110(Pt 1): 27-30.
55. Cerebrovascular selectivity and vasospasmodic action of the novel calcium antagonist (\pm)-(E)-1-(3-Fluoro-6,11-dihydrodibenz [b,e] oxepin-11-yl)-4-(3-phenyl-2-propenyl)- piperazine dimaleate in isolated cerebral arteries of the rabbit and dog / H. Minato, M. Hashizume, Y. Masuda et al. *Drug Res.* 1997; Vol. 47: P. 339-46.
56. PKC and Rho in vascular smooth muscle: activation by BOXes and SAH CSF / G.J. Pyne-Geithman, S.G. Nair, D.N. Caudell et al. *Front Biosci.* 2008; Vol. 13: P. 1526-34.
57. Interactive role of protein kinase C-delta with rho-kinase in the development of cerebral vasospasm in a canine two-hemorrhage model / K. Obara, S. Nishizawa, M. Koide et al. *J. Vasc. Res.* 2005; 42(1): 67-76.
58. Involvement of Rho GTPase in the transcriptional inhibition of preendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells / O. Hernandez-Perera, D. Perez-Sala, E. Soria et al. *Circ. Res.* 2000; Vol. 87: P. 616-22.
59. Alteration of basilar artery rho-kinase and soluble guanylylcyclase protein expression in a rat model of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage / C.J. Wang, P.Y. Lee, B.N. Wu et al. *Biomed Res. Int.* 2014; Vol. 531: P. 508.
60. Taguchi K., Kaneko K., Kubo T. Protein kinase C modulates Ca^{2+} -activated K^{+} channels in cultured rat mesenteric artery smooth muscle cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2000; 23(12): 1450-4.
61. Thin and thick filament regulation of contractility in experimental cerebral vasospasm / I. Kim, B. Leinweber, M. Morgalla et al. *Neurosurgery.* 2000; Vol. 46: P. 440-6.
62. Endothelin-1 initiates the development of vasospasm after subarachnoid hemorrhage through protein kinase C activation, but does not contribute to prolonged vasospasm / S. Nishizawa, D. Chen, T. Yokoyama et al. *Acta. Neurochir. (Wien).* 2000; Vol. 142: P. 1409-15.

Сведения об авторах:

Воронков Андрей Владиславович, зав. каф. фармакологии с курсом клинической фармакологии, доктор мед. наук, доцент, e-mail: a.v.voronkov@rmedpharm.ru

Игнатъева Г.А., 2016
УДК 616-092

Игнатъева Г.А.

Технологии получения вакцинных препаратов: движение от биотехнологических платформ к химическому синтезу антигенных эпитопов, современный взгляд

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24, Россия

Цель: представить краткий обзор истории практики вакцинаций и истории развития технологий производства вакцинных препаратов, привлечь внимание современной медицинской науки к обозначенной проблеме, в первую очередь в отношении вакцинных препаратов, предназначенных для применения на детях. **Методика:** в обзор включен материал нескольких монографий, выпущенных солидными издательствами (WILEY; Academic Press, etc.). Особый интерес представляют материалы по биотехнологическим платформам производства вакцин, опубликованные сотрудниками фирм-производителей, таких, как Merck & Co; Sanofi Pasteur; Dynavax Europe/Rhein Biotech GmbH; Latham Biopharm Group; Aridis Pharmaceuticals LLC; Genentech; Amgen; Shamir Biologics LLC; Biopharm Services US; Novartis Pharma AG, а также исследовательских центров и контролирурующих администраций: Laboratory of Bacterial Polysaccharides, Center for Biologics Evaluation and Research; Purdue University, West Lafayette, IN, US; Department of Pharmaceutical Chemistry, Univ. Of Kansas; Max Planck Institute for dynamics of Complex Technical Systems; Fraunhofer USA Center for Molecular Biotechnology; US Dep. of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service, etc. **Результаты:** сведения о практиках прививок против контагиозных болезней встречаются в исторической литературе о средневековых Китае, Персии, Византии, американских индейцах, индийских и африканских народов. Со времени возникновения современной иммунологии как нормативной науки в последнем десятилетии XIX в платформы производства вакцинных препаратов «двигались» в следующей последовательности: in vivo (выращивание и аттенуация микробов в организмах животных); in ovo (с 1931 г. по предложению E. Goodpasture вакцинные штаммы вирусов стали выращивать в яйцах птиц); в 1949 г. J.F. Enders разработал систему массовой наработки вируса полиомиелита в первичной культуре клеток почек обезьян in vitro. В первичных культурах in vitro фибробластов куриных эмбрионов выращивают вирусы кори, паротита, бешенства. **Заключение:** кроме позитивной цели вакцинаций — профилактики нескольких заболеваний, приводимый материал дает возможность задуматься о таком явлении как межвидовая трансмиссия «не титульных» инфекционных патогенов, происходящих из биотехнологических платформ. Примеры инфекционных заболеваний человека, в том числе новых, пришедших по путям межвидовой трансмиссии от животных, известны. С 2000-х годов в целях повышения экономической рентабельности массового производства вакцин в США и других т.н. западных странах в качестве платформ для производства вакцинных штаммов возбудителей стали использовать перевивные опухолевые линии клеток. В обзоре приведены примеры конкретных линий клеток и вакцин, на них выращиваемых. Мы предлагаем не забывать вирусную теорию этиологии онкологических заболеваний, сформулированную Л.А. Зильбером в 1960-х годах и получившую мировое признание, а также более ранние работы Пейтона Рауса по инфекционности сарком у кур, и работы других исследователей по онкогенным вирусам. В обзоре рассмотрены также биотехнологические платформы производства рекомбинантных белков и вирусоподобных частиц в качестве субъединичных вакцин. Кроме исторически первых одноклеточных платформ E. Coli, S. albicans упомянуты и новые платформы «опережающего развития» — растения, водоросли, неодноклеточные грибы, а также синтетические пептиды.

Ключевые слова: вакцинация, межвидовая трансмиссия, инфекционные патогены, рекомбинантные белки, биотехнологические платформы.

Для корреспонденции: Игнатъева Г.А., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии ГНЦ «институт Иммунологии ФМБА России gaiti2007@mail.ru

Для цитирования: Игнатъева Г.А., Технологии получения вакцинных препаратов: движение от биотехнологических платформ к химическому синтезу антигенных эпитопов, современный взгляд. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 143–147.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила: 13.05.2016

Ignateva G.A.

Vaccine manufacturing and technology: from biotechnological platforms to syntethic epitopes, current viepoint

State Research Center «Institute of Immunology», Federal Medical and Biological Agency of Russia, 115478 Moscow, Kashirskoe shosse, 24, Russia

The Purposes: the review take into account short history of vaccination practice and development of vaccine technology. **Methods.** In the review we include data from several monographs about manufacturing of vaccines published by authors from such companies as Merck & Co; Sanofi Pasteur; Dynavax Europe/Rhein Biotech GmbH; Latham Biopharm Group; Aridis Pharmaceuticals LLC; Genentech; Amgen; Shamir Biologics LLC; Biopharm Services US; Novartis Pharma AG, and several research centers: Laboratory of Bacterial Polysaccharides, Center for Biologics Evaluation and Research; Purdue University, West Lafayette, IN, US; Department of Pharmaceutical Chemistry, Univ. Of Kansas; Max Planck Institute for dynamics of Complex Technical Systems; Fraunhofer USA Center for Molecular Biotechnology; US Dep. of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service, etc. **Results.** In historic literature there are data about inoculation practices in antique China, Persia, India, Byzantium, native Americans, some African population. In modern immunology since the end of XIX century the vaccines were produced at the in vivo platforms — in animals (rabbits, mice, cows). Since 1931 due to E. Goodpasture' elaboration most virus vaccines were and are produced at the in ovo platform. In 1949 J.F. Enders elaborated large-scale polio virus production in the primary culture of monkey kidney cells in vitro. Up to day primary culture of chicken embryo fibroblasts are used to large-scale production of vaccine viruses of measles, mumps, rabies. Since 2000-th in Western countries most part of virus vaccines were began to produced via a cultivation in continuous tumor cell lines. The last technology is the most low cost for large-scale production of vaccines. We review several new biotechnological platforms for the production of the recombinant protein or virus-like particles as subunit vaccines: plant system, algae, mushrooms, insect cells, etc. **Conclusion.** Beside of good purpose of vaccination — prophylactic of several infectious deseases, doctors must take into account possibility of inter-species transmission of unknown pathogens (retroviruses, prions, etc) from biotechnological platforms — animals, cell cultures — into human population, and don't ignore L.A. Zilber' the-ory of virus' etiology of cancer diseases.

Keywords: inter-species transmission, infectious pathogens, recombinant protein, biotechnological platforms.**Subject terms:** Vaccines technology; platform evolution; inter-species transmission**For citation:** Ignateva G.A. Vaccine manufacturing and technology: from biotechnological platforms to syntethic antigenic epitopes, current viepoint. *Patologicheskaya fiziologiya I eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60 (4): 143–147 (In Russ.).**For correspondence:** Galina A. Ignateva, Doctor of Medical Sciences, Professor, State Research Center «Institute of Immunology», Federal Medical and Biological Agency of Russia, 115478 Moscow, Kashirskoe shosse, 24, Russia; e-mail: gaiti2007@mail.ru**Conflict of interest:** The author declare no conflict of interest.**Funding:** federal budget.**Received** 13.05.2016

Практика вариоляций — прививок от оспы — пришла в Европу из Византии с 1722 г. и до настоящего времени имеет характер «трансляционной медицины», хотя такой термин появился недавно. Это означает, что к вакцинации (пусть сначала под названием вариоляции, термин «вакцина» ввел Э. Дженнер в 1796 г.) людей приступали незамедлительно после опытов, подчас единичных, на животных, без каких бы то ни было клинических испытаний [1]. О необходимости разработки правил доказательной медицины, т.е. двойных слепых плацебо-контролируемых и проспективных исследований безопасности и эффективности препаратов, предназначенных для введения в организм человека, впервые задумались только с 60-х годов XX века после трагической истории с талидамидом. Вакцинация по целеполаганию —

это моделирование инфекции, но с использованием микроба со сниженной патогенностью (аттенуированного) или искусственного биотехнологического конструктора (рекомбинантных белков, VLP — вирусоподобных частиц), или синтетических пептидов и их производных.

Будем дальше говорить только о вирусных инфекциях и вакцинах против них, имея в виду, что принципиальные вопросы относительно бактериальных и токсинных вакцин те же, каждый со своей спецификой.

Ближе всего к естественной инфекции оказываются аттенуированные цельновирусные вакцины. В этих случаях не стоит задача исследований по поиску протективных эпитопов патогенов и работа по созданию вакцинного препарата в целом оказывается относитель-

льно быстровыполнимой. Но две проблемы «лежат на поверхности». Первая: аттенуированный, но живой микроорганизм, попадая *in vivo* во множество тел, будет эволюционировать и, вероятно, «в свою пользу», что может быть сопряжено с возрастанием его патогенности и/или формированием очагов латентной инфекции [2—4]. Вторая: технологии массового производства вакцин с «начала времен» и до настоящего времени были и продолжают оставаться биотехнологическими, что обязывает иметь в виду присутствие в вакцинных препаратах сопутствующих микробных патогенов и/или векторов экспрессии, происходящих из биолатформ. Ниже мы приводим фактическую информацию, опубликованную сотрудниками крупных международных фирм-производителей вакцин (Merck&Co.; Sanofi Pasteur; Dynavax Europe/Rhein Biotech GmbH; Genentech; Lab. of Bacterial Polysaccharides; Ardis Pharmaceuticals; Amgen; Biopharm Services US; Novartis Pharma AG, et al) [5]. На сегодня используют следующие биотехнологические «платформы» для производства вирусных вакцин или вирусоподобных частиц:

- 1) *in vivo* (в организмах животных);
- 2) *in ovo* (в птичьих яйцах);
- 3) первичные культуры клеток из тканей животных;
- 4) перевивные трансформированные (опухолевые) культуры клеток животных и человека. Для получения рекомбинантных белков и их производных используют бактериальные клетки, одноклеточные грибы, клетки растений.

Из небиотехнологических методов получения вакцин нам известен только химический синтез пептидных препаратов антигенов и их производных.

При выращивании массы патогенов для производства вакцин *in vivo* в тех или иных животных главный и неустраняемый риск технологического происхождения — межвидовая трансмиссия сопутствующих патогенов животных в человеческую популяцию. Тем не менее по технологиям *in vivo* до настоящего времени производят, например, вакцину от японского энцефалита JE-VAX®, которую выращивают в мозге мышей. В 2007 г. лицензия на эту вакцину приостановлена в США, но действует в Ю. Корее, Тайване, Тайланде, Вьетнаме.

С 1931 г. по предложению E. Goodpasture ряд вирусных вакцин начали выращивать *in ovo* — в куриных или других птичьих яйцах. Так выращивают, например, вирусы гриппа, желтой лихорадки и другие.

Выращивание массы патогенов в первичных культурах клеток из тканей животных освоили с середины XX века. С 1949 г. по предложению J.F. Enders в первичных культурах клеток почки обезьян начали выращивать вакцинный вирус полиомиелита. В неко-

торых странах в культурах клеток почки обезьян выращивали вирус оспы. В первичных культурах фибробластов куриных эмбрионов выращивают вакцинные вирусы кори, паротита, бешенства.

И содержание животных, и организация инкубаторов для многих тысяч яиц весьма затратны при массовом производстве вакцин. По заключениям производителей легче и выгоднее оказалось выращивать массовые количества микробных патогенов в перевивных трансформированных линиях клеток, к чему и приступили с начала 2000-х годов производители вакцин в США и Европе.

В открытых публикациях называют клетки Vero — трансформированные клетки почки зеленой африканской обезьяны, которые используют в производстве вакцинных штаммов вирусов полиомиелита и ротавирусов: Ixiaro®, Imojev®, Ipol®, Rotateq®, Rotarix®.

Используют в технологиях производства ряда вакцин перевивные клетки линий WI-38 (диплоидные клетки легкого человека, США), MRC-5 (диплоидные клетки легкого человека, Англия). Клетки WI-38 используют для производства вакцинных штаммов вируса краснухи в составе комплексного вакцинного препарата M-M-R II. Клетки MRC-5 используют для производства вакцинных штаммов вирусов варицеллы, гепатита А, полиовируса и вируса бешенства (Varivax®, Vaqta®, Havrix®, Imovax®, Poliovox®, FRhL-2 для Rotashield®). В банках перевивных клеток для производства вакцин есть также предложение линии MDCK из клеток почки собаки. Эти клетки используют в производстве противогриппозных вакцин Optaflu®, Celtura®, Flucelvac®.

Продолжают работы по созданию в качестве субстратов (платформ) для производства вакцин перевивных рекомбинантных клеточных линий, представляющих собой не спонтанно трансформированные клетки человека и животных, а целенаправленно трансфицированные вирусными или клеточными онкогенами клетки в целях их иммортализации. В качестве примера приводят линии клеток PER.C6®, AGEL1.CR®, CAP®, EB66®.

Обратим внимание только на то, что в отношении вакцин, производимых по вышеназванным технологиям, невозможно ни знать точный состав вакцинных препаратов, включая неустраняемые технологические примеси в виде онковирусов, ретровирусов и др., ни отделить искомым вакцинный патоген от технологических примесных потенциальных патогенов.

Технологии наработки рекомбинантных белков и их производных в качестве субъединичных вакцин или вирусоподобных частиц вначале базировались на биотехнологических платформах бактерий, в первую

очередь *E. coli*. В качестве эукариотических клеточных платформ начали использовать одноклеточные грибы. Прототипной рекомбинантной вакциной, нарабатываемой в грибах *Saccharomyces cerevisiae*, стал белок вируса гепатита В — HBsAg, представляющий собой гидрофобный липопротеин из 226 аминокислот, самособирающийся в клетках грибов в вирусоподобные частицы — VLP. Разработаны и системы экспрессии заданных антигенов в одноклеточных грибах *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis*. Создание рекомбинантных микроорганизмов сопряжено с риском их неуправляемого распространения в биосфере и, соответственно, инфицирование ими людей и животных, на которое никто не рассчитывал. По-видимому, главным образом по этой причине биотехнологи разрабатывают и иные платформы, не инфекционные по природе. Исследуют возможности наработки вакцинных препаратов в неодноклеточных грибах *Agaricus bisporus*, в водорослях *Chlamydomonas reinhardtii*, в растениях, например в водяной *Lemna* и др. В качестве векторов экспрессии в растениях используют растительные РНК-содержащие вирусы: *Tobacco mosaic virus*; *Potato virus X*; *Alfalfa mosaic virus*; *Cowpea mosaic virus*. Вакцинные препараты из растительных платформ в настоящее время находятся только на стадии экспериментальных исследований. На эту тему опубликованы работы по рекомбинантным антигенам энтеротоксигенной *E. coli* (Lt-B Ag), *Bacillus anthracis*, *Norwalk virus capsid protein*, HBsAg, RSV и ряд других, включая полиовирус и вирус гепатита С.

Без использования биотехнологических платформ получить вакцинные препараты в виде отдельных молекул и, соответственно, без неустраняемых технологических биопримесей можно химическим синтезом. Главная и самая большая трудность такого направления — поиск протективных эпитопов, а также эффективных и безопасных адъювантов. Но и полученных по уже внедренным вышеназванным биотехнологиям число лицензированных вакцин в мире составляет всего 25—30, причем далеко не все лицензированные вакцины предназначены для массового применения.

В любом варианте число вакцин несопоставимо меньше числа инфекционных болезней. Во многих странах и в настоящее время национальные календари прививок включают всего 4—6 традиционных вакцин от «детских инфекций» (вирусов кори, паротита, краснухи, экзотоксинов дифтерийной и столбнячной палочек). Относительно недавно предложенные вакцинные препараты — полисахаридные компоненты *Haemophilus influenzae* и *Neisseria meningitidis*, конъюгированные с белковыми молекулами-носителями, рекомбинантные антигены двух субтипов HPV (*Hum*

man papillomavirus) (Gardasil®), VLP, содержащий HBsAg антиген HBV не являются пока что повсеместно признанными. Более существенно, что никому не удастся до сих пор получить протективные вакцины против так называемых социально-значимых эпидемических, и даже пандемических заболеваний, таких, как ВИЧ-инфекция, туберкулез и малярия. Нет вакцин ни против одной из венерических инфекций, против лейкозов вирусной этиологии, т.е. болезней, затрагивающих большое число людей и которые, в первую очередь ВИЧ-инфекцию, ВОЗ в последние 30 лет классифицирует как глобальный кризис здоровья человечества.

В заключение скажем, что вакцинация — это моделирование инфекции в предполагаемо безопасном варианте. При инфекциях «дикого типа» у человека, конечно, возможны и бывают осложнения инфекционного заболевания. Однако вакцины содержат нечто новое по сравнению с инфекциями «дикого типа». При вакцинации специфического инфекционного заболевания не ожидают, но в отличие от «дикой инфекции» вакцинные препараты могут содержать (или не могут не содержать) неидентифицируемые технологические примесные, в том числе и инфекционные патогены, привносимые из производственных биоплатформ. Межвидовая трансмиссия инфекций с животного материала человеку — это природное, распространенное и давно известное явление. Цель этого краткого обзора — привлечь внимание современной медицинской науки к обозначенной проблеме, в первую очередь в отношении вакцинных препаратов, предназначенных для применения на детях. Фундаментальная иммунология — наука молодая, не канонизированная, наши знания — «капля в море незнания» и уже, казалось бы, имеющиеся знания довольно быстро меняются. Есть немало примеров прикладных внедрений, опережающих формирование научных представлений о природных механизмах развития иммунного ответа, иммунологической памяти, иммунопатогенетических механизмах развития многих видов заболеваний. Стратегия в отношении вакцинации детей подразумевает особую ответственность, поскольку сами дети не принимают решения, они целиком в руках взрослых. Из детей вырастают все взрослые — производительные и демографические силы страны и всего человечества. Предложения по применению для введения детям продуктов опухолевых клеток, в том числе и вакцин, требуют серьезного обдумывания. Вакцинация взрослых, как правило, имеет другие цели и задачи, главным образом потому, что взрослые сами принимают решения, как например, в случае запланированной работы в регионах, где зафиксированы случаи особо опасных инфекционных заболеваний.

References

1. Khaitov R.M., Ignateva G.A., Sidorovich I.G. Immunology: in normal physiology and in pathology. Textbook for medical students, 3rd ed., Moscow: Meditsina; 2010. 751 pp. (in Russian)
2. Miller N.Z. Vaccines: are they really safe and effective. Santa Fe, New Mexico: New Atlantean Press; 2015. 127 p.p.
3. Largent M.A. Vaccine. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 2012, 222 p.p.
4. B.R. Bloom, P-H Lambert, eds. The Vaccine Book. San Diego, London: Academic Press; 2003. 436 pp.
5. P.Wen, R. Ellis, N.S. Pujar, eds. Vaccine Development and Manufacturing. Hoboken, New Jersey: WILEY; 2015. 523 pp.
6. Ignateva G.A., Maksutov A.Z., Lvov V.L. Experimental research the vaccines to fast modifying pathogens: multi-epitope antigens and new adjuvants. Экспериментальное исследование кандидатных вакцин против изменчивых или множественных патогенов: мультиэпитопные антигены и новые рецептор-направленные адъюванты. Ж-л Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2011; № 3: 5-9 (in Russian)
7. Ignateva G.A., Ignatev T.I. Biological properties of immunoadjuvants: historical and modern knowleges. Physiology and pathology of the Immune system Биологические свойства иммуноадъювантов: история вопроса и современные представления. Physiology and pathology of the Immune system. 2010; № 1: 15-21 (in Russian)

© Онищенко Н.А., 2016
УДК: 577.125.8:615.217.4+616.12-008.331.1

Онищенко Н.А.

Цитогенетическая рекапитуляция, индуцированная медикаментозными препаратами, как универсальный этап формирования срочной защиты органов от повреждения при трансплантации

ФГБУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России, отдел Биомедицинских технологий и тканевой инженерии, Россия, 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1

В обзоре рассмотрены современные представления о клеточных механизмах формирования фармакологическими препаратами срочной защиты органов от повреждения при трансплантации. На примере ишемического повреждения почек показано, что при использовании препаратов разных фармакологических групп наиболее выраженным защитным эффектом обладают те из них, которые действуя в рамках неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем, отчетливо индуцируют в органах эволюционно выработанные признаки цитогенетической рекапитуляции: поддерживают клеточный гомеостаз на сниженном уровне за счет активации гликолиза и конформационных перестроек макромолекул, а также изменения в клетках содержания воды — снижения свободной и повышения связанной.

Ключевые слова: ишемия; противоишемические препараты; неспецифический адаптационный синдром клеточной системы; цитогенетическая рекапитуляция.

Для корреспонденции: Онищенко Нина Андреевна, гл. науч. сотр., доктор мед. наук, проф., отдел «Биомедицинских технологий и тканевой инженерии», ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России, e-mail: allanik64@yandex.ru

Для цитирования: Онищенко Н.А. Цитогенетическая рекапитуляция, индуцированная медикаментозными препаратами, как универсальный этап формирования срочной защиты органов от повреждения при трансплантации. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 148–153.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 21.02.2016

Onishchenko N.A.

Cytogenetic recapitulation, induced by medical preparations, as the universal stage of formation of urgent protection against damage at organ transplantation

Federal State Budgetary Institution «Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs», Ministry of Health of the Russian Federation, 1, Schukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation

In this article modern representations about cellular mechanisms of formation by pharmacological preparations of urgent protection of organs against damage are given at transplantation. On an example of ischemic damage of kidneys it is shown, that at use of preparations of different pharmacological groups by the most expressed protective effect those from them which operating within the limits of a nonspecific adaptive syndrome of cellular systems, clearly induce in organs the evolutionary developed signs of cytogenetic recapitulation possess: support a cellular homeostasis at the lowered level at the expense of activation of a glycolysis and conformational reorganizations of macromolecules, and also change in cells of water contain- decrease of free and increase of bound.

Keywords: ischemia, anti-ischemic preparations, nonspecific adaptive syndrome of cellular system, cytogenetic recapitulation.

For correspondence: Nina A. Onishchenko, chief scientific worker, doctor med. sci, professor, Federal State Budgetary Institution «Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs», Ministry of Health of the Russian Federation, 1, Schukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation, department of biomedical technologies and tissue engineering. E-mail: allanik64@yandex.ru

For citation: Onishchenko N.A. Cytogenetic recapitulation, induced by medical preparations, as the universal stage of formation of urgent protection against damage at organ transplantation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2016; 60 (4): 148–153. (in Russ.).

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 21.02.2016

Введение

Согласно современному определению, рекапитуляция — это повторение в онтогенезе организмов признаков эволюционного развития их далеких предков, проявляющихся в их структуре, химизме и функциях [1].

Подробный анализ масштабности явления рекапитуляции в биологии и медицине содержится в монографии А.Г. Бабаевой и Н.М. Геворкян «О рекапитуляции при регенерации и заболеваниях» (2013) [2].

Между тем, важный эволюционно выработанный неспецифический механизм выживания клеток и органов при действии различных стресс-раздражителей заслуживает отдельного рассмотрения. Сведения о возникновении признаков рекапитуляции в клетках на ранних стадиях развития неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем (НАСКС) имеют большое значение не только в теоретическом плане, но и для выбора стратегии и тактики применения лечебных и профилактических воздействий в клинической медицине, в частности для ускоренного повышения толерантности клеток и органов к повреждению. Именно от степени выраженности ранних стадий адаптационного синдрома в значительной степени зависит дальнейший исход НАСКС: задержится ли он на стадии устойчивой адаптации и обеспечит выживание или перейдет в стадию дезадаптации и вызовет гибель клеточных систем. С помощью этих ранних стадий клеточная система может обеспечить коррекцию своего состояния и быть чувствительной к корригирующим факторам, в качестве которых могут выступать медикаментозные препараты.

Цели обзора — показать:

- на примере ишемического повреждения донорских органов при трансплантации показать, что признаки цитогенетической рекапитуляции (функциональной, структурной и биохимической) ускоренно возникают в донорском органе при ишемии и изоляции;
- что признаки цитогенетической рекапитуляции можно профилактически вызвать в переживающих органах с помощью некоторых фармпрепаратов и тем самым улучшить их состояние;
- что фармпрепараты наиболее активно индуцируют признаки цитогенетической рекапитуляции в интактных органах (до их ишемического повреждения), за счёт которых оптимизируются резервы устойчивости донорских органов к предстоящему повреждению.

1. Механизмы реализации неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем

Известно, что воздействие на ткань раздражителей слабой или умеренной силы, не превышающей эволюционно выработанную норму адаптации, индуцирует в клетках животных, находящихся на разных уровнях эволюционного развития, комплекс стереотипных приспособительных изменений, позволяющий объединить их понятием «неспецифический адаптационный синдром клеточной системы» (НАСКС) [3]. В отличие от сохраняемых различий в специфичности функции клеток разных органов количественные изменения специфичности функций и субстанционные клеточные проявления НАСКС (морфологическое, физико-химическое и биохимическое состояние клеток) — неспецифичны и наблюдаются у любых клеток при действии разнообразных неблагоприятных факторов. При этом адаптационный синдром, как известно, в своём развитии проходит четыре стадии: мобилизации, формирования устойчивой адаптации, устойчивой адаптации и дезадаптации, приводящей клетки к гибели.

В первой стадии действия любого раздражителя, в том числе подавляющего жизнедеятельность, обычно возникает аварийная мобилизация функционального и метаболического резервов клеток для сохранения их гомеостаза. Клетка в создавшихся условиях функционирует на пределе нормы адаптации, причем этот феномен мобилизации отмечен не только у высших животных и человека (например, при переходе животных к спячке, при введении организма в состояние искусственной гипотермии), но и у растений (например, повышение интенсивности фотосинтеза на ранних стадиях увядания листьев — эффект Бриллианта). Мобилизационный эффект выражается в том, что дыхание клетки уже в первую минуту может возрасти до 300%, образование молочной кислоты до 600—2000%, тогда как содержание креатинфосфата и АТФ падает до крайне низкого уровня, свидетельствуя о развитии энергодифицитного состояния.

В дальнейшем на фоне продолжающегося действия раздражителя наступает стадия формирования устойчивой адаптации, при которой происходит перераспределение клеточных энерготрат, но не на процессы, связанные со специфической функцией (работа может снижаться), или с поддержанием температуры тела (температура тела также может снижать-

ся), а на качественную перестройку энергетического обмена и самих функционирующих структур. Адаптивная перестройка энергетики клетки характеризуется сохранением повышенной активности гликолиза, а также активацией процессов разобщения окисления и фосфорилирования в митохондриях, что позволяет за счет изменения соотношения между мощностью и эффективностью образования энергии в клетках обеспечить большую скорость накопления в них АТФ.

В результате в ткани повышается уровень креатинфосфата, АТФ и суммарных адениннуклеотидов до 150—200% и таким образом ликвидируется возникшая энергетическая задолженность.

На мобилизационной стадии адаптационного синдрома, также как и на стадии формирования устойчивой адаптации в клетках накапливаются и выходят по градиенту концентраций во внеклеточное пространство ионы H^+ , K^+ , Mg^{2+} , ионы неорганического фосфата, ферменты гликолиза и гидролиза, свободные жирные кислоты, свободные радикалы, перекиси и другие продукты деградации липидов. В клетку же из внеклеточного пространства вследствие повышения проницаемости мембран по градиенту концентрации поступают ионы Na^+ , Ca^{2+} и вода. Возникающие в тканях биохимические перестройки связывают с изменением физико-химических и коллоидно-осмотических свойств цитоплазмы, а также с полимеризацией универсального белка — G-актина и денатурацией других клеточных белков, которые ведут к снижению функции клеток, но одновременно формируют проявления цитогенетической рекапитуляции [4—7], которые выражаются в изменении соотношения свободной и связанной воды в сторону уменьшения свободной, а также в повышении соотношения H_2O связанная / общие SH группы белка [4].

Полагают, что полимеризация актина, снижение рН, выход K^+ , накопление неорганического фосфата и другие биохимические сдвиги дают животной клетке ряд преимуществ, которыми она ранее не располагала: способствуют фиксации состояния клетки и выключению большинства биохимических процессов с тем, чтобы в благоприятных условиях клетка могла вновь перейти к прежней метаболической активности [7—9].

На стадии формирования устойчивой адаптации начинает нарастать также активация генетического аппарата, что способствует повышению нативных антиденатурационных свойств цитоплазмы [4]. Таким образом, из накопленных фактов следует, что цитогенетическая рекапитуляция, возникающая на ранних стадиях реализации НАСКС, характеризуется следующими свойствами:

1) способностью клеток снижать интенсивность своего функционирования и поддерживать гомеостаз

клеточной системы на новом сниженном уровне за счёт активации гликолиза и перераспределения энерготрат на качественную перестройку метаболизма для повышения устойчивости самих клеточных структур;

2) способностью поддерживать клеточный гомеостаз на новом сниженном уровне за счёт способности макромолекул цитоскелета и цитоплазмы осуществлять конформационные перестройки, поддерживаемые метаболитами, накапливающимися в клетках и внеклеточном пространстве на стадиях мобилизации и формирования устойчивой адаптации;

3) способностью клеток и клеточных систем снижать уровень своей жизнедеятельности путём уменьшения в клетках содержания свободной и увеличения количества связанной воды, способствуя их выживанию при неблагоприятных условиях.

2. Формирование резистентности трансплантируемых органов (почка) к ишемии при использовании фармакологических препаратов разных групп

Изучение проблем жизнеобеспечения донорских органов перед трансплантацией позволило констатировать стадийность развития их повреждения при ишемии, являющейся, как известно, основным повреждающим фактором в трансплантологии.

Было показано, что на ранних сроках воздействия ишемического фактора (для почки продолжительностью до 30—40 мин; для сердца — до 15—20 мин) возникающие в органах биохимические и структурные изменения были обратимы (устранялись при реперфузии) и сопровождалась сдвигами, аналогичными проявлениям НАСКС на мобилизационной стадии [10]: развивался ацидоз, снижался мембранный потенциал покоя клеток в результате выхода K^+ из клеток и резко активировался гликолиз и гликогенолиз. В почке крыс к 40 мин ишемии гликоген снижался с $2,85 \pm 0,089$ до $1,78 \pm 0,04$ мкмоль/г $p < 0,05$, лактат повышался с $2,7 \pm 0,3$ до $7,0 \pm 0,3$ мкмоль/г, $p < 0,05$; развивались конформационные перестройки макромолекул, что выражалось в изменении содержания общей, свободной и связанной воды: с $76,3 \pm 0,4$ до $76,7 \pm 0,5\%$; с $62,5 \pm 0,9$ до $56,0 \pm 0,7\%$ ($p < 0,05$); с $13,8 \pm 0,6$ до $20,7 \pm 0,6\%$ ($p < 0,05$) соответственно; в повышении SH-групп общих и быстрореагирующих: с $4,87 \pm 0,31$ до $6,71 \pm 0,17$ моль/ 10^5 г белка, $p < 0,05$ и с $3,2 \pm 0,21$ до $4,53 \pm 0,18$ моль/ 10^5 г белка, $p < 0,05$ соответственно; а также в снижении цАМФ с $406 \pm 8,2$ до $184 \pm 3,9$ пмоль/г ткани, $p < 0,05$. При увеличении срока ишемии почки с 40 до 90 мин развивалось необратимое повреждение этого органа, которое происходило на фоне глубокого торможения гликолиза

(убыль гликогена за этот период составила всего $0,38 \pm 0,05$ мкмоль/г ткани, а прирост лактата только $0,8 \pm 0,3$ мкмоль/г ткани) и развития выраженных деструктивных изменений почечной ткани (статистически значимое увеличение общей и свободной воды; снижение общих и быстрореагирующих SH-групп ниже исходного уровня). Полученные данные позволили констатировать, что уже на ранних сроках ишемического повреждения в клетках органа мобилизуются эволюционно выработанные механизмы рекапитуляции, но таким путем обеспечивается лишь краткосрочная защита клеток донорского органа от гибели. Предстояло ответить на вопрос: как и с помощью каких механизмов фармакологические препараты, традиционно используемые в клинической практике, способны формировать и пролонгировать повышение резистентности донорских органов к ишемии.

2.1. Влияние фармакологических препаратов на структуру тканевых макромолекул, функцию и энергоснабжение ткани почки при ишемии

Было изучено 7 препаратов разных фармакологических групп, которые вводились подкожно однократно и в терапевтически допустимых дозах за 1 ч до моделирования ишемии. Среди препаратов были: лазикс-диуретик; пентоксил — регулятор метаболических процессов; гидрохинон — регулятор окислительно-восстановительных процессов; витамин E-антиоксидант; трентал — ингибитор фосфодиэстеразы, лидокаин — ингибитор мембранных фосфолипаз, стабилизатор клеточных мембран; преднизолон — гормональный препарат с выраженным мембран — стабилизирующим эффектом.

Оценку эффективности защитного действия препаратов производили у крыс с ишемией единственной почки, которую моделировали путём пережатия почечной артерии сроком на 90 мин. Оценивали выживаемость животных и состояние функциональных тестов (диурез, креатинин крови и клиренс эндогенного креатинина). Было установлено [10], что 90 мин ишемии в контроле (без введения медикаментозных препаратов) приводили к резкому нарушению азото-выделительной функции почек, и на 2-е—7-е сут. все крысы погибали. В тоже время при предварительном введении всех фармакологических препаратов (за исключением лазикса) удавалось, хотя и в разной степени, снизить повреждающие эффекты ишемии на почечную ткань и добиться выживания значительной части животных [10].

Было отмечено, однако, что у препаратов преимущественно метаболического типа действия (лазикс, пентоксил, гидрохинон) эффект противоишемической защиты был выражен в меньшей степени, чем у пре-

паратов с мембранотропной активностью (витамин E, трентал, лидокаин, преднизолон). Полученные результаты позволили предположить, что степень выраженности защиты почек, использованными препаратами, зависит от степени выраженности перестроек, возникающих, прежде всего, в тех структурах клеток, которые характеризуют развитие НАСКС.

Изучение изменения содержания общей, свободной и связанной воды, содержания общих и быстрореагирующих SH-групп, а также ц-АМФ (показатель адаптивной перестройки клеточных структур) в почечной ткани позволило установить [10], что все предварительно введенные фармакологические препараты приводили к статистически значимому снижению в ткани ишемизированной почки содержания общей воды, связанному в одних случаях больше со снижением содержания свободной воды, а в других — со снижением связанной воды. Эффективность защиты почек препаратами особенно тесно коррелировала с повышением цАМФ, с накоплением в их ткани общих и быстрореагирующих SH-групп и со снижением отношения $H_2O_{\text{связ.}}/SH_{\text{общ}}$, которое указывало на связь между изменением содержания связанной воды и изменением структуры белков, но косвенно также на связь структуры клеточной воды с активностью клеточных белков.

В норме отношение $H_2O_{\text{связ.}}/SH_{\text{общ}}$ в почке составляет 2,8, а через 90 мин ишемии это отношение увеличивается до 4,7. Предварительное введение лазикса, пентоксила и гидрохинона практически не влияло на изменение этого параметра по сравнению с контролем (ишемия), тогда как при применении всех остальных препаратов — витамина E, трентала, лидокаина и преднизолона — этот показатель через 90 мин ишемии снижался и был близок к показателю в интактной почке.

Высокая концентрация быстрореагирующих SH-групп и большее содержание цАМФ в клетках ишемизированной почки после предварительного введения эффективно действующих (мембранотропных) средств косвенно указывало на вызываемую ими перестройку энергетического метаболизма в клетках. Действительно, введение фармакологических препаратов до ишемии во всех опытах с последующей ишемией увеличивало продолжительность снижения в них окислительно-восстановительного потенциала, а также снижало темп расхода гликогена и накопление лактата в почечной ткани в процессе ишемии. Оказалось также, что в отличие от препаратов метаболического типа действия (лазикс, пентоксил, гидрохинон) препараты мембранного типа действия (витамин E, трентал, лидокаин, преднизолон), использованные в предишемическом периоде, при ишемическом воздействии были более мощными

блокаторами гликолиза в почечной ткани, следствием чего и явилось снижение темпа убыли гликогена и прироста лактата в ткани ишемизированных почек крыс.

Полученные результаты позволили нам заключить, что фармакологические препараты после предварительного введения улучшают сохранность всех макромолекулярных структур в почке при воздействии ишемии, так как формирование толерантности их к ишемии происходит уже в предишемическом периоде.

2.2. Влияние фармакологических препаратов разных групп на структуру тканевых макромолекул, функцию и энергоснабжение ткани интактной почки

Предварительное введение большинства из использованных препаратов уже через 1 ч приводило в клетках интактной почки к изменениям [10], которые являются ничем иным, как проявлением индуцированной цитогенетической рекапитуляции в них на медикаментозное стресс-воздействие. Это выражалось как в изменении конформации макромолекулярных веществ, так и в стимуляции реакций гликолиза и гликогенолиза в клетке (снижение содержания гликогена и накопление лактата наступало после введения практически всех эффективно действующих фармпрепаратов). Кроме того некоторые из препаратов мембранного типа действия — преднизолон, лидокаин и трентал уменьшали содержание свободной и увеличивали содержание связанной воды, тогда как другие — (витамин Е), наоборот, значимо увеличивали содержание свободной и уменьшали содержание связанной воды. Лазикс, пентоксил и гидрохинон достоверно не меняли распределение воды в клетках здоровой почечной ткани.

Такие индивидуальные различия в направленности изменений при воздействии медикаментозных препаратов можно объяснить тем, что показатель содержания связанной воды является интегративным, отражающим изменения в состоянии всех макромолекул клетки и поэтому специфика действия препаратов (т.е. конкретная мишень, на которую действует тот или иной мембранотропный препарат) может существенно влиять на этот показатель. Предварительное введение всех фармакологических препаратов в большей или меньшей степени увеличивало также общее содержание SH-групп в клеточных белках интактной почки. Однако статистически значимое увеличение этого показателя вызывали только преднизолон, лидокаин, трентал, и витамин Е. Увеличение содержания SH-групп в результате действия лазикса, пентоксила и гидрохинона было статистически незначимым. Содержание быстрореаги-

рующих SH-групп существенно увеличивалось при введении пентоксила, витамина Е и лидокаина. Примечательно, что обнаруженные нами изменения в содержании гликогена, лактата, связанной воды и общих SH-групп в ткани интактных почек через 1 час после введения наиболее эффективных фармакологических препаратов соответствовали изменениям тех же параметров при ишемии почек длительно до 40 мин, что, как известно, является сроком развития еще обратимых изменений.

Доказательства активации НАСКС и индукции цитогенетической рекапитуляции были получены нами также при формировании противоишемической резистентности сердца при предварительном введении витамина Е [11, 12], а также при формировании защиты донорских органов (почка) от гипотермического и криогенного повреждения при предварительном использовании мембранотропных фармпрепаратов, в том числе криопротектора ДМСО [13].

Заключение

Таким образом, формирование резистентности клеток, тканей и органов к действию повреждающих факторов при трансплантации (ишемия, низкотемпературное воздействие при консервации органов) происходит всегда с участием универсального эволюционно выработанного механизма — НАСКС, причем медикаментозным препаратам при этом отводится роль адаптогенов, чаще всего умеренной силы. Включение НАСКС на стадии мобилизации и формирования устойчивой адаптации всегда сопровождается стереотипными энергозависимыми функциональными (снижение функции) и структурными перестройками (конформационными, физико-химическими, биохимическими), которые следует отнести к проявлениям цитогенетической рекапитуляции, реализующим процессы срочной адаптации. Для выработки резистентности органов к действию повреждающих факторов в клинической медицине широко применяют препараты, индуцирующие в их клетках признаки цитогенетической рекапитуляции, например: используют антагонисты Ca^{+} , ингибиторы реabsорбции Na^{+} , K^{+} -содержащие препараты, ингибиторы мембранных АТФ-аз, фосфолипаз, фосфоорилаз и др. для снижения параметров клеточного гомеостаза до эволюционно допустимого уровня, чтобы активировать включение НАСКС. Между тем, во избежание развития дезадаптации при применении фармпрепаратов следует всегда учитывать исходный уровень энергетической задолженности в клетках и адаптирующий дозо-зависимый эффект используемого препарата.

References

1. Babaeva A.G., Gevorkjan N.M., Elchaninov A.V. Recapitulation and its signs at pathological processes. *Klinicheskaya I eksperimentalnaya morfologiya*. 2012, 2: 4-8 (in Russian)
2. Babaeva A.G., Gevorkjan N.M. *About recapitulation at regeneration and diseases*. Moscow: Publ. house «4 Mpress»; 2013 (in Russian)
3. Braun A.D., Mozjenok G.P. *Nonspecific adaptive syndrome of cellular system*. L.: Publ. House, «Nauka»; 1987 (in Russian)
4. Goldovsky A.M. *Basis of the doctrine about conditions of organisms*. L.: Publ. house «Nauka»; 1977. (in Russian)
5. Korn E.D. Action polymerization and its regulation by proteins from non-muscle cells. *Physiol. Rev.* 1982, v. 62: 672-737.
6. Therien H.M., Gruda J., Carrier F. Interaction of filamentous action with Isolated liver plasma membranes. *Europ. J. Cell Biol.* 1984, v.35: 112-21.
7. Permjakov E.A. *Pervalbumin and related Ca-binding proteins*. M., Medicine, 1985.(in Russian)
8. Penttila A., Glaumann H., Trump B.F. Protective effect of extra cellular acidosis against anoxia, thermal and p-chloro-mezcurebenzene sulfonic acid treatment of isolated rat liver cells. *Life Sci.* 1976, v. 18: 1419-30.
9. Melehov E.I. The Principle of regulation of damage process rate and reaction of protective inhibition of a metabolism (RPIM). *J. Common Biology*. 1985; 46(2): 174-89. (in Russian)
10. Shumakov V.I., Onishchenko N.A., Kirpatovsky V.I. *Pharmacological graft protection*. M.: Publ. House «Medicine» 1983. (in Russian)
11. Artamonov S.D., Danilov M. A, Lubjako A.A., Onishchenko N.A. Action of vitamin E on a myocardium energetic balance in norm, at an ischemia and a re-oxygenation. *Farmakologiya i toksikologiya*. 1985, 6: 28-33.(in Russian)
12. Kirpatovsky V.I., Lubjako A.A., Artamonov S.D. To the mechanism of various stability of heart and kidneys to action of a thermal ischemia. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 1985; 3: 31-5. (in Russian)
13. Onishchenko N.A., Kirpatovsky V.I. Influence of low temperatures on structurally functional integrity of the isolated organs. In Shumakov V.I. (ed.) «*Sketches on physiological problems of transplantology and application of artificial organs*». Tula: Publ. House. «Repronics Ltd.»; 1998, 152-179. (in Russian)

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616-092.18: 612.017.11

Матвеева В.Г., Григорьев Е.В.

Проблемы и перспективы изучения субпопуляций моноцитов крови в патогенезе заболеваний, связанных с воспалением

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

В обзоре представлены сведения о неоднородности моноцитов периферической крови, основанные на уникальных функциональных и фенотипических свойствах. Обсуждаются проблемы, возникшие при поиске оптимального способа выделения субпопуляций моноцитов по фенотипу, а также происхождения субпопуляций моноцитов и их роли в воспалительных процессах.

Ключевые слова: субпопуляции моноцитов, фенотип, воспаление.

Для корреспонденции: Матвеева Вера Геннадьевна, канд. мед. наук; ст. науч. сотр. лаб. клеточных технологий, отдел экспериментальной и клинической кардиологии; e-mail: matveeva_vg@mail.ru

Для цитирования: Матвеева В.Г., Григорьев Е.В. Проблемы и перспективы изучения субпопуляций моноцитов крови в патогенезе заболеваний, связанных с воспалением. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60(4): 154–159.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 07.05.2014

Matveeva V.G., Grigoriev E.V.

Problems and prospects of investigating monocyte subsets during the development of inflammation-associated diseases

FSBSI «Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases», Sosnovy Boulevard 6, Kemerovo, 650002, Russian Federation

In this review, we present information about a heterogeneity of monocyte subsets based on their unique functional and phenotypic properties. Here we also discuss the search of an optimal technique for the isolation of monocyte subsets as well as the origin of monocyte subsets and their role in inflammation.

Keywords: monocyte subsets, phenotype, inflammation.

For correspondence: Vera G. Matveeva, PhD, senior researcher, Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases», Sosnovy Boulevard 6, Kemerovo, 650002, Russian Federation, e-mail: matveeva_vg@mail.ru

For citation: Matveeva V.G., Grigoriev E.V. Problems and prospects of investigating monocyte subsets during the development of inflammation-associated diseases. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (43): 154–159. (in Russ).

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

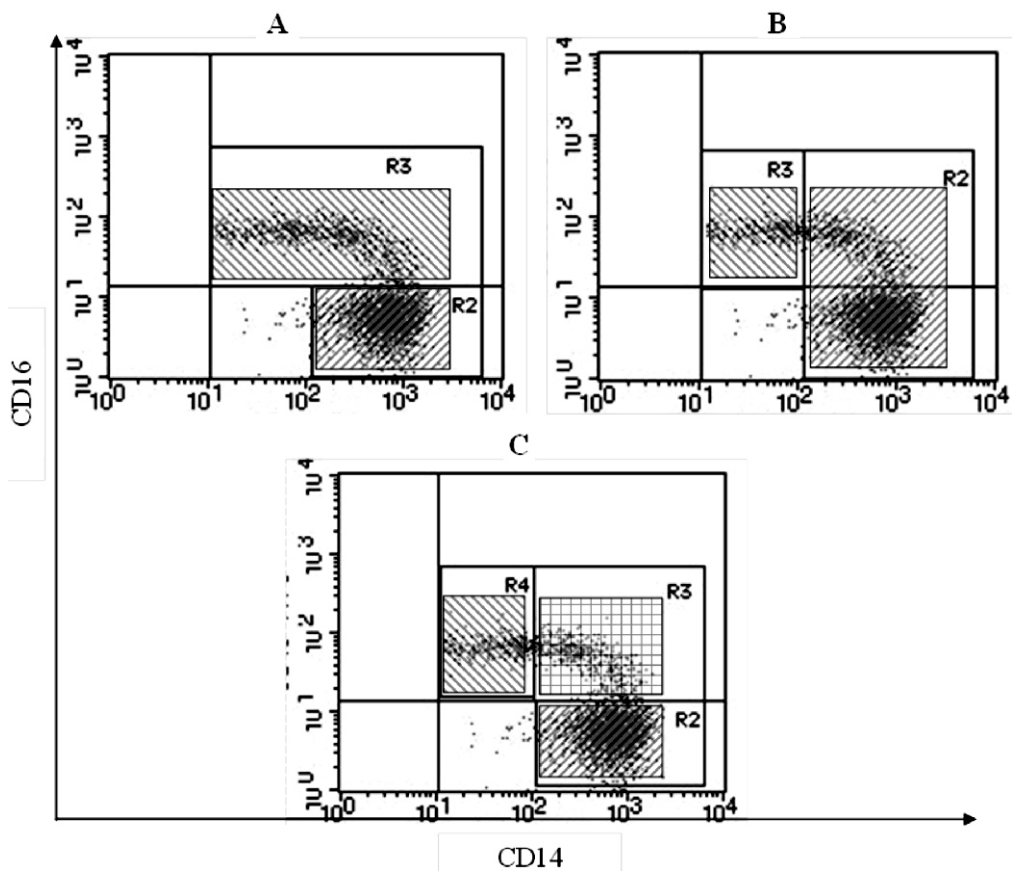
Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Vera Matveeva, <http://orcid.org/0000-0002-4146-3373>

Evgeny Grigoriev, <http://orcid.org/0000-0002-3898-0740>

Received 07.05.2014



мнению третьих, оправдано разделение моноцитов на три субпопуляции: $CD14^{hi}CD16^{-}$, $CD14^{hi}CD16^{+}$ и $CD14^{dim}CD16^{+}$ (рисунок, С) [9, 10]. Таким образом, моноциты с фенотипом $CD14^{hi}CD16^{+}$ оценивают то изолированно, то включают в состав других субпопуляций, что вносит серьезные изменения в оценке их свойств и усложняет интерпретацию результатов, полученных разными исследователями. Однако все авторы сходятся во мнении, что клетки различных субпопуляций моноцитов отличаются по функциональной активности, спектру секретируемых при активации цитокинов, набору и плотности представленных на мембране рецепторов и, соответственно, выполняют различные функции в организме.

Неоднородность популяции моноцитов показана в экспериментах на животных. Первоначально у мышей по уровню экспрессии поверхностных маркеров Gr и LybC были выделены 2 основные субпопуляции: $Gr1^{+}$ ($LybC^{+}$) и $Gr1^{-}$ ($LybC^{-}$) [11, 12], позднее доказано существование 3-й субпопуляции с уникальными свойствами Gr ($LybC^{dim}$) [2, 13]. Каждая субпопуляция обладает индивидуальным набором приоритетных функций.

Моноциты субпопуляции $Gr1^{+}$ выполняют важную роль в защите от инфекции и заживлении тканей [12]. Благодаря высокой экспрессии на мембране CCR2 (хемокиновый рецептор к MCP-1 (монокитарному хемотаксическому фактору-1)), CD62L (L-селектин) они способны мигрировать в очаг острого воспаления, где, для выполнения эффекторных функций, дифференцируются в воспалительные макрофаги или в антигенпрезентирующие дендритные клетки [14], например $Gr1^{+}$ могут дифференцироваться в клетки Лангенгарса. Активированные моноциты $Gr1^{+}$ обладают высокой фагоцитарной активностью, секретируют антимикробные факторы, цитокины, стимулируют пролиферацию T-эффекторов [2].

Характерная особенность моноцитов $Gr1^{-}$ связана с активным синтезом противовоспалительных (IL-10, TGF β (трансформирующий фактор роста β)) и проангиогенных факторов (VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), FGF (фактор роста фибробластов)) [11, 12]. Кроме того, субпопуляция $Gr1^{-}$ имеет на поверхности высокий уровень рецепторов к фракталкину (CX3CR1), но практически не имеет CCR2 и CD62L, в небольшом количестве экспрессирует рецепторы к воспалительным хемокинам (CCR1, CXCR1 и CXCR2) [11].

Фракталкин экспрессирован на мембране эндотелиальных и эпителиальных клеток и служит в качестве молекулы адгезии. Эксперименты с миграцией моноцитов через слой эндотелиальных клеток показали, что этот процесс идет с участием рецептора к фракталкину CX3CR1 [2]. Высокая экспрессия CX3CR1 позволя-

ет субпопуляции $Gr1^{-}$ осуществлять трансмиграцию через интактный эндотелий сосудов и пополнять запас резидентных тканевых макрофагов и дендритных клеток [13]. Субпопуляцию $Gr1^{-}$ называют даже «патрулирующей», поскольку клетки способны прикрепляться к эндотелиальной выстилке сосудов и, двигаясь вдоль капилляров, мелких вен и артерий, осуществлять контроль за состоянием эндотелия [11].

Динамичное изменение экспрессии фракталкина зарегистрировано при ишемических повреждениях. Показано снижение экспрессии фракталкина на эндотелиальных клетках на этапе острого повреждения, который длится от 1 до 4 сут., и повышение во 2-й фазе разрешения и заживления тканей. В соответствии с этим описано два этапа привлечения различных субпопуляций моноцитов при формировании фаз воспаления после инфаркта миокарда (ИМ) [15]. В острой фазе ИМ (первые 4 сут.), под действием высвобождающихся из поврежденных тканей провоспалительных цитокинов и хемокинов (CCL2), в очаг мигрируют моноциты $CD14^{hi}CD16^{-}$ ($Gr1^{+}$), на мембране которых экспрессированы рецепторы CCR2. Эта субпопуляция моноцитов фагоцитирует некротизированные и апоптотически измененные клетки, синтезирует протеазы, что приводит к санации очага повреждения и деградации внеклеточного матрикса, созданию условий для перемещения клеток. В период разрешения благодаря активной экспрессии фракталкина на поверхности поврежденного эндотелия в очаг воспаления мигрируют моноциты $CD14^{hi}CD16^{+}$ ($Gr1^{-}$), имеющие на мембране высокую плотность рецепторов к фракталкину [15]. Эти клетки принимают участие в репарации тканей, привлекая в очаг фибробласты, стимулируя ангиогенез, отложение коллагена, формируя грануляции, снижая проявление воспаления [11, 12].

В крови мышей обнаружено существование небольшой 3-й субпопуляции моноцитов с «промежуточным», умеренным уровнем экспрессии рецептора $Gr1^{dim}$ и CX3CR1, при этом термин «промежуточный» указывает на тот факт, что $Gr1^{+}$ моноциты являются предшественниками моноцитов $Gr1^{-}$ [10], вопреки мнению о независимом происхождении субпопуляций, поскольку они имеют различные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики [14].

Эксперименты на мышах с проходящей деплецией моноцитов выявили интересные взаимоотношения между различными субпопуляциями [2, 13]. В костном мозге большинство промоноцитов имели фенотип $Gr1^{+}$, поэтому в первые 5 сут. после процедуры деплеции все моноциты крови были $Gr1^{+}$. Через 5 сут. экспрессия $Gr1$ на поверхности моноцитов начинала снижаться и 7—9-м сут. соотношение моноцитов $Gr1^{+}/Gr1^{-}$ уравнивалось [13]. В другом эксперименте все моноциты, помеченные латексными частицами

как Gr1⁺, через 7—9 сут. полностью меняли фенотип Gr1⁺ на Gr1⁻ [2]. Относительно медленное превращение моноцитов в Gr1⁻ после деплеции согласуется с предположением, что преобразование моноцитов Gr1⁺ в Gr1⁻ требует определенного периода созревания в циркуляции и, в общем, свидетельствует в пользу теории общего костномозгового происхождения всех субпопуляций моноцитов с направлением дифференцировки Gr1⁺ → Gr1^{dim} → Gr1⁻.

С помощью молекулярно-биологических и генетических методов показано, что спектр экспрессируемых генов Gr1⁺ моноцитов мыши соответствует CD14^{hi}CD16⁻ моноцитам человека [13], клеткам Gr1^{dim} — субпопуляция CD14^{hi}CD16⁺, а Gr1⁻ — субпопуляция CD14^{dim}CD16⁺. Клиническое и экспериментальное изучение соответствующих трех субпопуляций моноцитов человека подтверждает происхождение и взаимоотношение между субпопуляциями, установленными в экспериментах на мышях. Показано, что транскрипция генов, ассоциированных с созреванием, прогрессивно повышается от CD14^{hi}CD16⁻ моноцитов к CD14^{dim}CD16⁺ [11]. Внутривенное введение моноцитарного колониестимулирующего фактора (M-CSF) добровольцам последовательно увеличивает содержание сначала промежуточной субпопуляции CD14^{hi}CD16⁺, и далее CD14^{dim}CD16⁺ [16]. Также длина теломер в моноцитах CD14^{dim}CD16⁺ короче по сравнению с другими субпопуляциями, соответствующая более зрелой стадии дифференцировки [9]. Эти исследования подтверждают, что моноциты CD14^{hi}CD16⁻ последовательно дифференцируются сначала в субпопуляцию CD14^{hi}CD16⁺ и далее в более зрелые моноциты CD14^{dim}CD16⁺. Поскольку все субпопуляции имеют индивидуальный набор специализированных функций, этот процесс позволяет быстро адаптироваться к изменяющимся условиям [16].

В норме приблизительно 90—95% моноцитов крови являются CD14^{hi}CD16⁻ и характеризуются выраженной фагоцитарной активностью, продукцией активных форм кислорода, оксида азота, миелопероксидазы, лизоцима, а также хемокинов IL-8, MCP-1, CCL3 [11].

При детализации фенотипа субпопуляций моноцитов человека основными рецепторами сравнения выступают CD64 (низкоафинный Fcγ рецептор), CD11c (α_x-цепь интегрина α_xβ2), HLA-DR (MHC II тип), CD62L, CCR2, CX3CR1 (таблица).

Благодаря высокой экспрессии рецепторов CCR2, CD64 на субпопуляции CD14^{hi}CD16⁻ эти клетки специализируются на активном фагоцитозе, способны мигрировать в очаг воспаления и дифференцироваться в воспалительные макрофаги [4, 10], а присутствие на поверхности CD62L обеспечивает хоуминг в лимфатические узлы.

Особенности экспрессии хемокиновых рецепторов и рецепторов адгезии на мембране моноцитов с фенотипом CD14^{dim}CD16⁺ способствуют повышенной тропности к эндотелию и высокую миграционную активность моноцитов даже через неактивированный слой эндотелиальных клеток [2], что определяет их распределение в организме. Известно что, моноциты CD14^{dim}CD16⁺ в циркулирующей крови составляют всего лишь до 25% от общего количества, тогда как основная их часть находится в маргинальном пуле крови вдоль эндотелия сосудов. Физическая нагрузка и стресс сопровождаются значительным повышением содержания моноцитов CD14^{dim}CD16⁺ в циркуляции за счет перемещения из маргинального пула [8]. Такое перераспределение субпопуляций связывают с повышением уровня катехоламинов в крови [17].

Субпопуляция CD14^{dim}CD16⁺ вызывает особый интерес у кардиологов, поскольку дискутируется их роль в развитии атеросклеротического процесса. По мнению одних ученых, они проявляют проатеросклеротическую активность и способствуют прогрессированию ИБС, поскольку являются активированными клетками с повышенной провоспалительной активностью, способными взаимодействовать с эндотелием сосудов [9]. Высокая плотность CX3CR1 на мембране моноцитов CD14^{dim}CD16⁺ создает условия для привлечения их в область с повышенной экспрессией фракталкина и трансмиграции через эндотелий с последующим прогрессированием атеросклероза [9, 11]. По мнению других исследователей, моноциты

Фенотипическая характеристика субпопуляций моноцитов (по результатам Tallone T., Turconi G., 2011 [10]) Таблица

Рецепторы	CD14 ^{hi} CD16	CD14 ^{hi} CD16 ⁺	CD14 ^{dim} CD16 ⁺
CD64	++	+	—
CD62L	+	+/-	—
CD11c	+	+++	++
CCR2	++	+	—
CX3CR1	—	++	++
HLA-DR	+	+++	++

CD14^{dim}CD16⁺ выполняют очистку стенок сосудов от отложений окисленных липопротеидов низкой плотности и апоптотически измененных клеток [18].

Сложности выделения минорной субпопуляции CD14^{dim}CD16⁺ не позволяют однозначно описать функциональные характеристики данных клеток, поскольку в их составе зачастую рассматривают субпопуляцию CD14^{hi}CD16⁺. По одним данным, субпопуляция CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺, включающая моноциты CD14^{dim}CD16⁺ и CD14^{hi}CD16⁺, обладает провоспалительными свойствами и продуцирует большое количество TNF α [7]. Напротив, при изолированном рассмотрении субпопуляции CD14^{dim}CD16⁺ описывают ее противовоспалительный профиль с умеренным синтезом TNF α и выраженной продукцией IL-1RA [9, 11].

Наиболее загадочной и менее изученной остается субпопуляция CD14^{hi}CD16⁺. Ее особенностью является высокая экспрессии HLA-DR, CX3CR1 и рецепторов CD11c, умеренная CD64, CCR2 и CD62L, что формирует некий переходный фенотип и определяет ее функциональные характеристики. Моноциты CD14^{hi}CD16⁺ обладают выраженной стимулирующей активностью на Th по сравнению с CD14^{dim}CD16⁺, что позволило Grage-Griebenow и соавторам предполагать, что фенотип этих клеток имеет иммунорегуляторный или промежуточный вариант между моноцитами и дендритными клетками [19]. Вместе с тем, экспериментально доказана неспособность, находящихся в циркуляции субпопуляций CD14^{hi}CD16⁺ и CD14^{dim}CD16⁺, к процессингу и презентации антигена, что характеризует эти клетки как моноциты костномозгового происхождения [11]. При изолированном рассмотрении свойств субпопуляции CD14^{hi}CD16⁺ подчеркивается их умеренная фагоцитарная активность, ограниченная способность к респираторному «взрыву» и синтезу хемокинов при одновременном высоком синтезе провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 β , IL-6) [11].

До сих пор не освещена роль моноцитов CD14^{hi}CD16⁺ в различных патологических процессах, поскольку в литературе в большинстве случаев рассматривают субпопуляцию CD14⁺CD16⁺, представляющую собой совокупность моноцитов CD14^{hi}CD16⁺ и CD14^{dim}CD16⁺. Тем не менее, зарегистрировано повышение содержания в крови моноцитов CD14⁺CD16⁺ при хронических и системных воспалительных процессах, например ревматоидном артрите, болезни Кавасаки, сепсисе, СПИДе [17].

В основе патогенеза атеросклероза лежит воспалительный процесс в артериальной стенке. На ранней стадии заболевания атеросклеротическая бляшка представляет собой инфильтрат, состоящий преимущественно из CD16-позитивных макрофагов [20]. В ряде исследований показана корреляционная связь

содержания CD16-позитивных моноцитов (CD14⁺CD16⁺) и уровнем липидов в крови у пациентов с гиперхолестеринемией [21, 22]. Повышение относительного содержания этих клеток отмечают у пациентов с заболеванием коронарных артерий и расценивают как независимый фактор риска [22].

Для приведения к единообразию данных при описании субпопуляций моноцитов в 2010 г. Интернациональной объединенной ассоциацией иммунологов принята номенклатура. В соответствии с ней выделяют 3 субпопуляции моноцитов крови человека (классическую CD14^{hi}CD16⁻, промежуточную CD14^{hi}CD16⁺, неклассическую CD14^{dim}CD16⁺⁺), которым соответствуют три субпопуляции у мышей (классическая Ly6C⁺⁺CD43⁺ (Gr1⁺), промежуточная Ly6C⁺⁺CD43⁺⁺ (Gr^{dim}), неклассическая Ly6C⁺CD43⁺⁺ (Gr1⁻)) [23].

Проточная лазерная цитофлюориметрия является основным методом для изучения фенотипа клеток. Выделение субпопуляций моноцитов при помощи цитофлюориметрического анализа по уровню экспрессии только двух поверхностных антигенов (CD14 и CD16) не позволяет корректно отделить моноциты от других клеток (лимфоциты, НК-клетки, нейтрофилы). Поэтому предлагается ввести дополнительный третий общемоноцитарный маркер, например CD86 или HLA-DR [16].

Результаты клинических и экспериментальных работ, проведенных в соответствии с номенклатурой, ясно демонстрируют уникальные свойства промежуточной субпопуляции моноцитов CD14^{hi}CD16⁺, их выраженную способность к стимуляции CD4 Т-клеток, проангиогенную активность. Подтверждается их высокий провоспалительный потенциал, поскольку в отсутствие стимуляции они в основном продуцируют активные формы кислорода, при стимуляции липополисахаридом избирательно синтезируют IL-1 β и TNF α [16].

Напротив, неклассические моноциты CD14^{dim}CD16⁺⁺ активно секретируют IL-1 β и TNF α в ответ на взаимодействие с вирусами и нуклеиновыми кислотами через TLR7-TLR8 зависимые сигнальные пути. При этом синтез этих цитокинов в меньшей степени происходит при контакте с липополисахаридом. Субпопуляция неклассических моноцитов экспрессирует широкий спектр адгезионных молекул, позволяющих передвигаться вдоль стенки сосудов и контролировать состояние эндотелия [16].

В клиническом исследовании Tarr et al. 2012 года [24] выполнено разделение моноцитов крови на три субпопуляции и изучена их динамика у пациентов после острого инфаркта миокарда с подъемом сегмента ST. Было обнаружено значительное повышение содержания промежуточной субпопуляции CD14^{hi}CD16⁺ в первые сутки после события. В то

время как в работе 2009 года японские ученые не обнаружили статистически значимого изменения количества CD16-позитивных моноцитов (CD14⁺CD16⁺) при выделении двух субпопуляций CD14⁺CD16⁻ и CD14⁺CD16⁺ [25]. Эти результаты наглядно демонстрируют важность и необходимость применения единой оптимальной стратегии разделения субпопуляций моноцитов для изучения их свойств. До сих пор нет целостного понимания роли различных субпопуляций моноцитов в патологических процессах, в том числе связанных с воспалительной реакцией, что открывает широкие перспективы для дальнейших исследований в этом направлении.

References

1. Yarilin, A. *Immunology: textbook [Immunologiya]*. М.: GEOTAR Media, 2010. (in Russian)
2. Tacke F., Ginhoux F., Jakubzick C., van Rooijen N., Merad M., Randolph G.J. Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *J. Exp. Med.* 2006; 203(3): 583-97.
3. Fogg D.K., Sibon C., Miled C., Jung S., Aucouturier P., Littman D.R. et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science*. 2006; 311(5757): 83-87.
4. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 12: 953-64.
5. Kim O.Y., Monsel A., Bertrand M., Coriat P., Cavailon J.M., Adib-Conquy M. Differential down-regulation of HLA-DR on monocyte subpopulations during systemic inflammation. *Crit. Care*. 2010; 14(2): R 61.
6. Ancuta P., Wang J., Gabuzda D. CD16⁺ monocytes produce IL-6, CCL2, and matrix metalloproteinase-9 upon interaction with CX3CL1-expressing endothelial cells. *J. Leukoc. Biol.* 2006; (5): 1156-64.
7. Belge K-U., Dayyani F., Horelt A., Siedlar M., Frankenberger M., Frankenberger B.E. et al. The Proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ Monocytes Are a Major Source of TNF. *J. Immunol.* 2002; 168: 3536-42.
8. Steppich B., Dayyani F., Gruber R., Lorenz R., Mack M., Ziegler-Heitbrock H.W. Selective mobilization of CD14⁺CD16⁺ monocytes by exercise. *Am. J. Physiol. Cel. Physiol.* 2000; 279(3): 578-586.
9. Merino A., Buendia P., Martin-Malo A., Aljama P., Ramirez R., Carracedo J. Senescent CD14⁺ CD16⁺ Monocytes Exhibit Proinflammatory and Proatherosclerotic Activity. *J. Immunol.* 2010; 186(3): 1809-15.
10. Tallone T., Turconi G., Soldati G., Pedrazzini G., Moccetti T., Vassalli G. Heterogeneity of Human Monocytes: An Optimized Four-Color Flow Cytometry Protocol for Analysis of Monocyte Subsets. *J. Cardiovasc. Trans. Res.* 2011; 4(2): 211-19.
11. Cros J., Cagnard N., Woollard K. Patey N., Zhang S-Y., Senechal B. et al. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*. 2010; 33 (3): 375-86.
12. Nahrendorf M., Swirski F.K., Aikawa E., Stangenberg L., Wurdinger T., Figueiredo J.L. et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* 2007; 204: 3037-47.
13. Sunderkotter C., Nikolic T., Dillon M.J., Van Rooijen N., Stehling M., Drevets D.A., Leenen P.J. Subpopulations of Mouse Blood Monocytes Differ in Maturation Stage and Inflammatory Response. *J. Immunol.* 2004; 172(7): 4410-17.
14. Geissmann, F., Jung S., Littman D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003; 19(1): 71-82.
15. Nahrendorf M., Pittet M.J., Swirski F.K. Monocytes: Protagonists of Infarct Inflammation and Repair After Myocardial Infarction. *Circulation*. 2010; 121: 2437-45.
16. Zawada A.M., Rogacev K.S., Sester M., Bohm M., Fliser D., Heine G.H. Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease. *Immunobiology*. 2012; 217(12): 1273-84.
17. Ziegler-Heitbrock L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 81(3): 584-92.
18. Mosig, S., Rennert K., Krause S., Kzhyshkowska J., Neunubel K., Heller R., Funke H. Different functions of monocyte subsets in familial hypercholesterolemia: potential function of CD14⁺CD16⁺ monocytes in detoxification of oxidized LDL. *FASEB J.* 2009; 23: 866-74.
19. Grage-Griebenow E., Zawatzky R., Kahlert H., Brade L., Flad H., Ernst M. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31(1): 48-56.
20. Merched A.J., Ko K., Gotlinger K.H., Serhan C.N., Chan L. Atherosclerosis: evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators. *FASEB J.* 2008; 22: 3595-606.
21. Feig J.E., Ronga J.X., Shamir R., Sanson M., Vengrenyuk Y., Liu J. et al. HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. *PNAS*. 2011;108 (34): 14371-7.
22. Schlitt A., Heine G.H., Blankenberg S., Espinola-Klein C., Doppeide J.F., Bickel C. et al. CD14⁺CD16⁺ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thromb. Haemost.* 2004; 92(2): 419-24.
23. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N. et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010; 116(16): 74-80.
24. Tapp L.D., Shantsila E., Wrigley B.J., Pamukcu B., Lip G.Y., The CD14⁺CD16⁺ monocyte subset and monocyte-platelet interactions in patients with ST-elevation myocardial infarction. *J. Thromb. and Haemost.* 2012; 10: 1231-41.
25. Tsujioka H., Imanishi T., Ikejima H., Kuroi A., Takarada S., Tanimoto T. et al. Impact of Heterogeneity of Human Peripheral Blood Monocyte Subsets on Myocardial Salvage in Patients With Primary Acute Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009; 54(2): 130-38.

Сведения об авторах:

Григорьев Евгений Валерьевич, доктор мед. наук, проф., зам. директора по научной и лечебной работе; e-mail: grigoriev@hotmail.com

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616-092.18, 4+576-53,54

Кошелева Н.В.^{1,3}, Сабурин И.Н.^{1,2}, Зурина И.М.¹, Горкун А.А.¹, Борзенко С.А.⁴,
Никишин Д.А.^{3,5}, Колокольцова Т.Д.^{1,2}, Устинова Е.Е.¹, Репин В.С.^{1,2,4}

Технология создания мультипотентных сфероидов из мезенхимных стромальных клеток лимба для репарации поврежденных тканей глаза

¹ — ФГБНУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии», 1253158, Москва, Балтийская ул., д. 8

² — ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, 123995, Москва, Баррикадная ул., д. 2/1, стр. 1

³ — Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

⁴ — ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59-а

⁵ — ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН, Россия, 119334, Москва, Вавилова ул., д. 26

На сегодняшний день показано, что стволовые и прогениторные клетки открывают новые возможности для восстановления поврежденных тканей глаза. Основным источником стволовых клеток для регенерации является сформированная в большей степени производными нервного гребня лимбальная зона глаза. Данное исследование посвящено разработке инновационной технологии создания 3D сфероидов из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток лимба (ММСК-Л). Показано, что в 3D условиях культивирования ММСК-Л за счет компактизации и мезенхимо-эпителиального перехода самоорганизуются в клеточные репаративные модули. Сформированные сфероиды ММСК-Л сохраняют и поддерживают недифференцированную популяцию стволовых и прогениторных клеток лимба, что подтверждает экспрессия таких факторов плюрипотентности, как Oct4, Sox2 и Nanog. Синтезируемый клетками сфероидов внеклеточный матрикс позволяет поддерживать функциональный потенциал ММСК-Л, участвующих в регенерации как переднего, так, вероятно, и заднего отрезков глаза.

Ключевые слова: 3D культура, клеточные сфероиды; технология создания сфероидов; мультипотентные мезенхимные стромальные клетки лимба (ММСК-Л).

Для цитирования: Кошелева Н.В., Сабурин И.Н., Зурина И.М., Горкун А.А., Борзенко С.А., Никишин Д.А., Колокольцова Т.Д., Устинова Е.Е., Репин В.С. Технология создания мультипотентных сфероидов из мезенхимных стромальных клеток лимба для репарации поврежденных тканей глаза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 160–167.

Для корреспонденции: Кошелева Настасья Владимировна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП; ст. науч. сотр. каф. эмбриологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, e-mail: n_kosheleva@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства РФ отделениям РАН (IV.12.1). Анализ экспрессии проведен при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-50-00029).

Благодарность. Авторы благодарят Кремнёва С.В. за помощь в подготовке проб для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Поступила 05.07.2016

Kosheleva N.V.^{1,3}, Saburina I.N.^{1,2}, Zurina I.M.¹, Gorkun A.A.¹, Borzenok S.A.⁴,
Nikishin D.A.^{3,5}, Kolokoltsova T.D.^{1,2}, Ustinova E.E.¹, Repin V.S.^{1,2,4}

The technology of obtaining multipotent spheroids from limbal mesenchymal stromal cells for reparation of injured eye tissues

¹ — FSBSI «Institute of general pathology and pathophysiology», 8, Baltiyskaya st., Moscow, Russian Federation, 125315

² — Russian Medical Academy of Postgraduate Education, 2/1, Barrikadnaya st., Moscow, Russian Federation, 123995

³ — Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1, pp. 12, Leninskiye gory, Moscow, Russian Federation, 119234

⁴ — Fyodorov Eye Microsurgery Complex FSBI, 59a, Beskudnikovsky boulevard, Moscow, Russian Federation, 127486

⁵ — FSBSI «Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences», 26, Vavilova st., Moscow, Russian Federation, 119334

It is known that stem and progenitor cells open new possibilities for restoring injured eye tissues. Limbal eye zone, formed mainly by derivatives of neural crest, is the main source of stem cells for regeneration. The current study considers development of innovative technology for obtaining 3D spheroids from L-MMSC. It was shown that under 3D conditions L-MMSC due

to compactization and mesenchymal-epithelial transition self-organize into cellular reparative modules. Formed L-MMSC spheroids retain and promote undifferentiated population of stem and progenitor limbal cells, as supported by expression of pluripotency markers — Oct4, Sox2, Nanog. Extracellular matrix synthesized by cells in spheroids allows retaining the functional potential of L-MMSC that are involved in regeneration of both anterior and, probably, posterior eye segment.

Keywords: 3D culture, cell spheroids, technology of obtaining spheroids, limbal multipotent mesenchymal stem cells (L-MMSC).

For citation: Kosheleva N.V., Saburina I.N., Zurina I.M., Gorkun A.A., Borzenok S.A., Nikishin D.A., Kolokoltsova T.D., Ustinova E.E., Repin V.S. The technology of obtaining multipotent spheroids from limbal mesenchymal stromal cells for reparation of injured eye tissues. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (4): 160–167. (in Russ.)

For correspondence: Nastasia V. Kosheleva, PhD of Biological Sciences, Leading Researcher work Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»; 8, Baltiyskaya st., Moscow, Russian Federation, 125315. E-mail: n_kosheleva@mail.ru

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

Funding. This study was financially supported by the Government of Russian Federation to the State Academy of Sciences (IV.12.1). Molecular analysis of expression was financially supported by the Russian Science Foundation (project 14-50-00029)

Acknowledgments. The authors are grateful to Kremnyov S.V. for his valuable help with the preparation of samples for Real-time PCR study.

Information about authors:

Kosheleva N.V., <http://orcid.org/0000-0002-2665-4972>

Saburina I.N., <http://orcid.org/0000-0003-2014-2535>

Zurina I.M., <http://orcid.org/0000-0002-3275-0215>

Gorkun A.A., <http://orcid.org/0000-0001-5859-812X>

Nikishin D.A., <http://orcid.org/0000-0002-9238-9206>

Введение

На сегодняшний день во всех областях медицины, в том числе и в офтальмологии стволовые и прогениторные клетки представляют потенциальный интерес, как для фундаментальных исследований, так и для клинического применения в регенеративной медицине, открывая новые возможности восстановления поврежденных органов и тканей или регуляции их функциональной активности. Исследования последних лет показали, что зона лимба глаза является основным источником стволовых клеток для регенерации роговицы в норме и патологии, и потенциальным источником для восстановления тканей заднего отрезка глаза.

Зона лимба глаза находится на границе конъюнктивы и роговицы и является уникальной нишей региональных эпителиальных и мезенхимных стволовых клеток глаза, окруженных внеклеточным матриксом, стромальными компонентами, кровеносными сосудами и меланоцитами. Фибробластоподобные мезенхимные клетки лимба, являющиеся производными нервного гребня — это основной регенерационный резерв глаза, именно они восстанавливают эпителиальные популяции роговицы и лимба после повреждающих воздействий [1, 2].

Первым зону лимба как железу, вырабатывающую жидкость для смачивания роговицы, описал Манц (Manz) в середине XIX века в опубликованной в 1859 году работе «Железы на границе роговицы». В 1971 г. Давангер (Davanger) и Эвенсен

(Evensen) выявили, что лимб служит источником обновления клеток роговицы. А в 1978 году Шофилд (Schofield) предположил, что микроокружение палисад Фогта поддерживает нишу стволовых клеток лимба, регулируя их функциональный, пролиферативный и дифференцировочный потенциал. В настоящее время ведутся поиски других источников стволовых клеток роговицы, но общепризнано, что поддержание гомеостаза и обновление эпителия роговицы происходит именно за счет стволовых клеток лимба через несколько транзиторных популяций [3].

Популяция клеток зоны лимба глаза — кольца толщиной 1,5–2 мкм, разграничивающего прозрачную роговицу и непрозрачную склеру, поддерживает нормальную структуру и функции роговицы [4]. Многочисленные врожденные и приобретенные заболевания, травмы, могут повредить лимбальные стволовые клетки и их нишу, что морфологически проявляется в патологическом разрастании конъюнктивы по роговице, поражении эпителия роговицы, развитии хронического воспаления и неоваскуляризации роговицы, что приводит к ее помутнению и потере зрения [5]. В таких ситуациях трансплантация роговицы не эффективна, желателно обеспечить восстановление самой лимбальной зоны.

Часто для восстановления резерва стволовых клеток лимбальной зоны используют HLA-совместимую трансплантацию фрагментов лимба от живого донора или из постмортального материала [5]. Другим подходом, экономичным донорский материал, позволяющим

стандартизовать образец и контролировать контаминацию, является трансплантация культуры клеток лимба в суспензии или на носителе. Аутологичный материал можно применять при односторонних нарушениях в отсутствие врожденных или приобретенных системных поражений. В настоящее время идет разработка методов терапии с использованием аутологичных клеток букального эпителия, пульпы зуба, ММСК из различных источников. Применение более доступного аллогенного материала является перспективным и успешно развивается, но возможные иммунологические реакции реципиента требуют обязательного проведения курсов иммуносупрессорной терапии [6, 7].

В Европе аутологичные ММСК-Л с 2015 г. разрешены для клинического применения при лечении ожогов глаз. Продукт на основе культивированных аутологичных ММСК-Л *Holoclar* получил разрешение для клинического применения Европейского агентства лекарственных средств и Европейской комиссии. ММСК-Л успешно применяют в Канаде и Новой Зеландии при лечении острой реакции «трансплантат против хозяина» у детей [7].

В настоящее время активно разрабатываются и создаются новые технологии для поддержания и стимуляции регенерации пула стволовых клеток, локализованных преимущественно именно в лимбальной зоне глаза [3].

Цель исследования — представить технологию создания сфероидов из ММСК-Л направленную на разработку уникальных репаративных клеточных модулей и микротканей для лечения различных патологий как переднего, так и заднего отрезков глаза.

Методика

2D и 3D культуры ММСК-Л. Первичную культуру ММСК-Л выделяли методом эксплантационного культивирования из фрагмента ткани зоны лимба постмортального глаза человека [8, 9]. Выделенные клетки до 4-го пассажа культивировали в стандартных 2D условиях (37°C, 5% CO₂) в полной ростовой среде DMEM/F12 (1:1, БиолоТ, Санкт-Петербург) с добавлением L-глутамина (2 мМ/л, ПанЭко, Москва), гентамицина (50 мкг/мл, ПанЭко), инсулина-трансферрина-селенита (1:100, БиолоТ), 20 нг/мл bFGF (ProSpec, Израиль) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). ММСК-Л 4-го пассажа использовали для получения в агарозных планшетах (MicrotissuesTM, США) 3D культуры — клеточных сфероидов, посевная концентрация 250 тыс. кл./мл. Формирование сфероидов изучали методом прижизненной цейтраферной фазово-контрастной микроскопии с использованием прибора Cell-IQ (CM Technologies, Финляндия).

Имунофенотипирование клеток 2D культуры 4-го пассажа и 14-суточных сфероидов проводили по следующему профилю поверхностных маркеров: CD29, CD90, CD105, CD44, CD49e, HLA-ABC, CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19. Пробы инкубировали в темноте (15 мин, 25°C) с антителами (10 мкл антител на 1 млн клеток), конъюгированными с флуоресцентными красителями (FITC — fluorescein isothiocyanate, PE — phycoerythrin, PC5 Phycocyanin-Cyanin 5.1). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, Inc, США).

Для изучения структуры сфероидов были выбраны методы *просвечивающей и растровой электронной микроскопии*. Материал фиксировали в глutarовом альдегиде (1,5%, 1—2 ч), дофиксировали OsO₄ (1%, 1—2 ч), обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, ацетоне и заключали в смесь эпоксидных смол Araldite M и Araldite Hardener (Sigma, США), с добавлением катализатора DMP30 и пластификатора дибутилфталата (+60°C, 3—5 сут.). Ультратонкие срезы контрастировали по стандартной методике [10] и изучали с использованием микроскопа JEM-1011. Для растровой электронной микроскопии сфероиды, после фиксации и обезвоживания высушивали в критической точке, напыляли в вакууме золотом, полученную реплику сканировали с использованием микроскопа CamScan.

Эта часть работы выполнена на оборудовании лаборатории электронной микроскопии ЦКП МГУ им. М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

Для иммуноцитохимического окрашивания сфероиды фиксировали в 4% параформальдегиде (20 мин, +4°C), инкубировали с первичными антителами к E- и N-кадгеринам, ламинину и фибронектину (1:100; Thermo Scientific, США), затем со вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромами FITC или DyLight594 (0,1 мк/мл; Thermo Scientific, США), анализировали с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа FluoView FV10i (Olympus, Япония).

Для изучения изменения в сфероидах уровня экспрессии генов плюрипотентности (Oct4, Nanog, Sox2) и регулирующего эпителио-мезенхимный переход (ЭМП) транскрипционного фактора Zeb1 использовали метод *полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени*. Тотальную РНК выделяли, используя TRIReagent (Sigma, США) и ДНКазу I типа (Fermentas, Германия), осаждали в 4M LiCl, её концентрацию измеряли на спектрофотометре Nanod-

гор 8000 (Thermo Scientific, США). С использованием обратной транскриптазы M-MLV (Евроген, Россия) и рандомных гексануклеотидов (Силекс, Россия) проводили синтез кДНК. Анализ проводили на автоматическом амплификаторе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием смеси qPCRmix-HSSYBR+ROX (Евроген, Россия). Расчет относительной экспрессии гена выполняли методом $\Delta\Delta Ct$ с учетом эффективности реакции, определенной методом построения стандартных кривых [11].

Результаты и обсуждение

Выселение ММСК-Л из эксплантатов ткани лимба постмортального материала происходило через 10—14 сут. культивирования. Выселившиеся клетки имели характерную веретеновидную форму, формировали монослой за 3—5 сут. и сохраняли высокий пролиферативный потенциал на протяжении всего периода 2D культивирования. На 4-м пассаже ММСК-Л экспрессировали характерные для ММСК маркеры (CD105, CD90 и CD29), практически не экспрессировали маркеры гемопоэтического и лимфоцитарного ряда CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19. ММСК-Л экспрессировали рецепторы к внеклеточному матриксу CD44 и CD49e, обеспечивающие клеточную адгезию. Выявлялась экспрессия поверхностных пептидов молекул главного комплекса гистосовместимости I класса — HLA-ABC, характерных для всех соматических клеток. Сведения об иммунофенотипическом профиле культуры приведены в таблице. Полученная и охарактеризованная культура

ММСК-Л соответствовала результатам предыдущих исследований мезенхимной популяции лимба глаза человека [9, 12, 13] и имела свойства, характерные для ММСК из костного мозга [2].

В эмбриогенезе ММСК-Л берут начало от клеток нервного гребня, хорошо дифференцируются в производные эктодермы, обладают выраженными иммуносупрессивным и нейротропным действиями [14, 15]. Дефицит популяции стволовых клеток глаза и прежде всего его лимбальной зоны вызывает многочисленные нарушения зрительного аппарата и приводит к органическим нарушениям структуры анализатора и необратимой потере зрения. Для восполнения дефицита стволовых клеток лимба глаза применяют консервативные и хирургические, основанные на трансплантации аутологичных или аллогенных эксплантатов лимба или культивированных лимбальных клеток, методы лечения [16]. Выделение аутологичных эксплантатов травматично, такой материал плохо поддается стандартизации. Клетки в монослойной культуре лишены трехмерного микроокружения (ниши). Предлагаемая нами новая технология создания уникального потенциального материала для терапии дефицита стволовых клеток лимба основана на 3D культивировании аутологичных или аллогенных ММСК-Л. В 3D условиях за счет адгезионных взаимодействий между клетками получают самоорганизующиеся стандартные легко масштабируемые трехмерные структуры — клеточные сфероиды [17].

Технология культивирования в агарозных планшетах позволила масштабировать процесс получения стандартных сфероидов, каждый сфероид формировался в своей лунке из заданного количества клеток.

Таблица

Иммунофенотипический анализ экспрессии поверхностных маркеров ММСК-Л на 4-м пассаже 2D и 3D культуры. Сфероиды проанализированы на 14-е сут. 3D культивирования (среднее значение \pm стандартное отклонение)

Анализируемые маркеры	2D культура ММСК-Л (%)	3D культура ММСК-Л, 14 сут. (%)
CD105 (эндоглин, компонент рецептора к TGFbeta)	88,2 \pm 8,6	56 \pm 9,1
CD90 (Thy-1, гликопротеин суперсемейства иммуноглобулинов, обеспечивает взаимодействия клеток между собой и с внеклеточным матриксом)	99,5 \pm 0,3	92,3 \pm 6,3
CD29 (рецептор фибронектина, субъединица $\beta 1$ -интегрина)	79 \pm 21	65,2 \pm 10
CD44 (рецептор для гиалуроновой кислоты)	100	100
CD49e (интегриновый рецептор для фибронектина и фибриногена)	99,5 \pm 0,6	100
HLA-ABC (молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса)	100	98,2 \pm 0,5
CD45 (LCA, общий антиген лейкоцитов)	10,1 \pm 2,7	15 \pm 2,1
CD34 (поверхностный антиген предшественников гемопоэза)	10 \pm 6,5	1,3 \pm 0,3
CD14 (активирующий макрофаги рецептор липополисахаридов и эндотоксинов)	4,9 \pm 1,4	4,1 \pm 0,7
CD11b (интегрин α -M, участвующий во взаимодействии лимфоцитов)	9 \pm 2,8	2,5 \pm 0,4
CD19 (B-лимфоцитарный антиген, трансмембранный гликопротеин, способствует проведению сигнала)	6,4 \pm 1,8	54,8 \pm 8,7

Процесс компактизации сфероидов начинался уже в первые часы 3D культивирования и продолжался до 7-х сут. (рис. 1). На 3-и сут. размер сфероидов приближался к диаметру сформированного компактного 7-дневного сфероидов, и составлял 150 мкм. Сфероиды поддерживали в 3D условиях в течение 14 сут., после 7-х сут. их диаметр и морфология практически не изменялись.

Клетки 14-суточных сфероидов сохраняли высокий уровень экспрессии характерных для ММСК маркеров, практически не экспрессировали маркеры гемопоэтического и лимфоцитарного ряда CD34, CD14, CD11b и CD45. В отличие от 2D культуры, в сфероидах почти на 50% возрастал уровень экспрессии В-лимфоцитарного антигена CD19 (таблица). Согласно данным литературы, повышение уровня экспрессии CD19 в культурах ММСК из различных источников связано с межклеточной сигнализацией в популяции ММСК [18].

Проведенный иммуноцитохимический анализ показал накопление компонентов внеклеточного матрикса (фибронектина и ламинина) во внутренней зоне сфероидов к 7-м сут. и, особенно к 14-м сут. Накопление компонентов внеклеточного матрикса в сфероидах клеток лимба было отмечено и в совместной работе индийских и американских ученых [12]. Можно предположить, что накопление внеклеточного матрикса и его распределение именно во внутренней зоне сфероидов является ключевым показателем реконструкции сложной ниши, поддерживающей структурно-функциональный потенциал ММСК-Л. Возмож-

но, высокий уровень экспрессии молекул адгезии и взаимодействия с внеклеточным матриксом в сочетании с описанным повышением уровня синтеза сигнальной молекулы CD19 обеспечивает сфероидам эффективную организацию уникальной трехмерной структуры.

Характерный для эпителиального фенотипа клеток маркер межклеточных контактов E-кадгерин накапливался в поверхностных клетках сфероидов и, начиная с 7-х сут. его выявляли в зонах межклеточных контактов. Экспрессию характерного для мезенхимных клеток N-кадгерина в первые сутки 3D культивирования наблюдали в ядрах, по мере формирования и компактизации сфероидов уровень экспрессии падал, а локализация перемещалась в цитоплазму.

Компоненты ниши стволовых клеток лимба, сами стволовые клетки и их производные могут гармонично сосуществовать и функционировать только в сложной сбалансированной системе. Предлагаемая технология получения сфероидов позволяет легко и эффективно реконструировать 3D межклеточные взаимодействия, поддерживающие функциональный потенциал уникальных клеток лимба.

Ранее нами показано, что сфероиды из различных клеточных популяций состоят из поверхностной и внутренней зон, отличающихся морфологией и иммунофенотипом клеток [19, 20]. Анализ строения поверхностной зоны сфероидов ММСК-Л методами электронной микроскопии подтвердил и дополнил наблюдения, полученные методом прижизненной цейтраферной микроскопии. Клетки 4–5 наружных

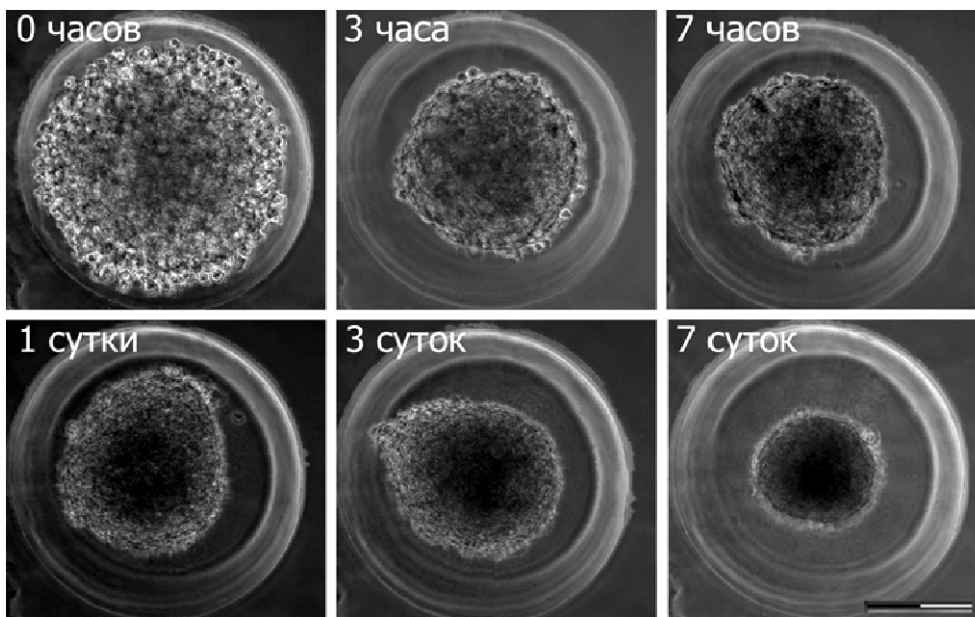


Рис. 1. Динамика формирования сфероидов из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток лимба (ММСК-Л) в 3D культуре. Прижизненная цейтраферная световая микроскопия с фазовым контрастом. Измерительный отрезок 100 мкм.

слоев сфероидов уплощались, располагались черепицеобразно, обеспечивая постепенное уплотнение поверхностной зоны и компактизацию в 3D культуре (рис. 2А-Г). Во внутренней зоне клетки располагались рыхло, между ними присутствовали многочисленные компоненты внеклеточного матрикса (рис. 2В, Д).

Интересные результаты были получены при количественном исследовании, проведенном методом ПЦР в реальном времени, был проанализирован относительный уровень экспрессии (RQ) транскрипционных факторов *Ost4*, *Sox2*, *Nanog* и *Zeb1*. В сфероиде на 7-е сут. была отмечена тенденция увеличения экспрессии *Sox2* и *Nanog* при значимом понижении уровня экспрессии *Zeb1* относительно 2D культуры (рис. 3).

Экспрессия транскрипционных факторов *Ost4* и *Nanog* является необходимым условием для поддержания плюрипотентности клеток внутриклеточной массы бластоцисты. *Ost4* блокирует дифференцировку клеток в трофантодермальном направлении, позже *Nanog* дополнительно блокирует превращение клеток внутренней клеточной массы в гипобласт (примитивную энтодерму) и стимулирует самообновление эпибласта. При гастрюляции экспрессия этих транскрипционных факторов постепенно снижается и исчезает. Транскрипционный фактор *Sox2* в клетках внутриклеточной массы бластоцисты формирует комплекс с *Ost4* и контролирует соотношение клеток эпибласта и гипобласта [21, 22]. Высокий уровень экспрессии *Sox2* в дальнейшем характерен для дифференцирующихся производных эктодермы [23]. *Zeb1* — один из ключевых регуляторов эпителио-мезенхимного потенциала (ЭМП),

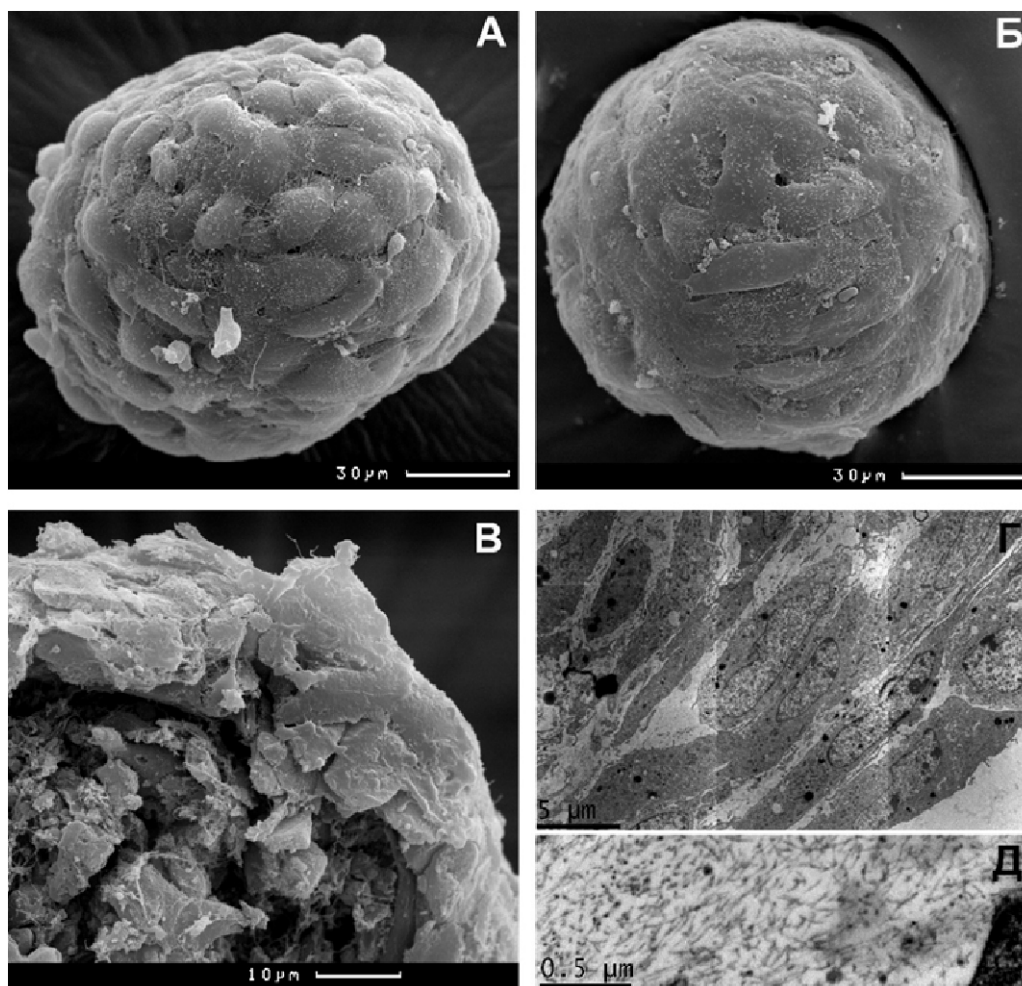


Рис. 2. Строение 7 сут. (А, В) и 14 сут. (Б, Г, Д) сфероидов из ММСК-Л. А, Б — общий вид поверхности сфероидов. В — скол сфероид, видны слои уплощенных клеток поверхностной зоны и округлые клетки внутренней зоны, разделенные волокнами внеклеточного матрикса. Г — 4–5 слоев уплощенных клеток поверхностной зоны с высоким ядерно-плазменным отношением, внутренняя зона расположена слева. Д — волокна внеклеточного матрикса во внутренней зоне сфероид. А–В — растровая электронная микроскопия; Г–Д — трансмиссионная электронная микроскопия.

RQ, относит единицы

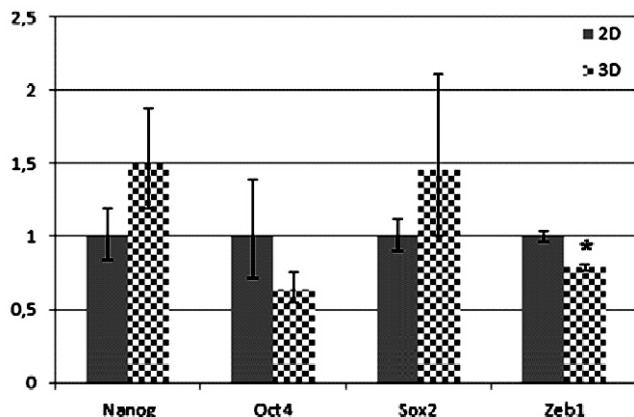


Рис. 3. Экспрессия генов Nanog, Oct4, Sox2 и Zeb1 в 2D и 3D культурах ММСК-Л. Сфероиды после 7 сут. 3D культивирования. Приведены средние значения ± стандартное отклонение. Звездочкой обозначено статистически значимое отличие значения в 3D культуре относительно 2D культуры (p<0,05).

Метод ПЦР в реальном времени, RQ – относительные единицы, данные нормализовали по репортерному гену ODC и пробам 2D культуры.

он блокирует экспрессию белка адгезивных контактов эпителиальных клеток E-кадгерина [24, 25]. В свою очередь, повышение экспрессии E-кадгерина и мезенхимо-эпителиальный переход (МЭП) являются необходимым условием для получения индуцированных плюрипотентных клеток *in vitro* и тесно связаны с появлением эндогенной экспрессии Oct4 и Sox2 при репрограммировании клеток [26].

Полученные данные по экспрессии кадгеринов и снижению уровня экспрессии Zeb1 при формировании сфероидов ММСК-Л свидетельствуют о МЭП, сопровождающем сфероидообразование. Выявленная тенденция к повышению уровня экспрессии Nanog и Sox2 в сфероиде ММСК-Л указывает на репрограммирование клеток при образовании сфероидов. По данным проведенных ранее исследований в сфероиде мезенхимный фенотип сохраняется в основном у клеток внутренней зоны, поверхностная зона, как правило, сформирована уплощенными клетками эпителиального фенотипа с характерным комплексом межклеточных контактов [9, 20, 27—29].

Заключение

Проведенные исследования показали, что клеточные сфероиды из суспензионной культуры ММСК-Л имеют преимущества перед уже разрешенной к клиническому применению монослойной 2D клеточной культурой лимба. Сформированные сфероиды ММСК-Л сохраняют и поддерживают недифференцированную популяцию функциональных стволовых и прогениторных клеток лимба,

что подтверждает экспрессия таких факторов плюрипотентности, как Oct4, Sox2 и Nanog. Уникальное сочетание эпителио-мезенхимного потенциала и особенности анатомического расположения на границе прозрачной роговицы и непрозрачной склеры позволяют ММСК-Л участвовать в регенерации как переднего, так, вероятно, и заднего отрезков глаза. Предлагаемая нами технология получения сфероидов позволяет легко и эффективно реконструировать функциональные 3D межклеточные взаимодействия, поддерживающие функциональный потенциал уникальных клеток лимба.

References

1. Dziasko M.A., Tuft S.J., Daniels J.T. Limbal melanocytes support limbal epithelial stem cells in 2D and 3D microenvironments. *Experimental eye research*. 2015; 138: 70-9.
2. Nakatsu M.N., Gonzalez S., Mei H., Deng S.X. Human Limbal Mesenchymal Cells Support the Growth of Human Corneal Epithelial Stem/Progenitor Cells Limbal Mesenchymal Cells for Stem Cell Expansion. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2014; 55(10): 6953-9.
3. Khan-Farooqi H., Chodosh J. *Autologous Limbal Stem Cell Transplantation: The Progression of Diagnosis and Treatment. Seminars in ophthalmology*: Taylor & Francis; 2016: 91-8.
4. Singh V., Shukla S., Ramachandran C., Mishra D.K., Katikireddy K.R., Lal I., et al. Chapter Two-Science and Art of Cell-Based Ocular Surface Regeneration. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2015; 319: 45-106.
5. Queiroz A.G., Barbosa M.M.O., Santos M.S., Barreiro T.P., Gomes J.A.P. Assessment of surgical outcomes of limbal transplantation using simple limbal epithelial transplantation technique in patients with total unilateral limbal deficiency. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*. 2016; 79(2): 116-8.
6. Atallah M.R., Palioura S., Perez V.L., Amescua G. Limbal stem cell transplantation: current perspectives. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)* 2016; 10: 593.
7. Trounson A., McDonald C. Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges. *Cell Stem Cell*. 2015; 17(1): 11-22.
8. Borzenok S., Saburina I., Repin V., Kosheleva N., Gorkun A., Komakh Y., et al. Methodological and technological problems of artificial cornea engineering based on 3D cellular cultivation. *Oftal'mokhirurgiya*. 2012; (4): 12.
9. Kosheleva N.V., Zurina I.M., Saburina I.N., Gorkun A.A., Kolokoltsova T.D., Borzenok S.A., et al. The impact of fetal bovine serum on formation of spheroids from eye stromal limbal cells. *Patogenez*. 2015; 13(2): 4-11. (in Russian)
10. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of cell biology*. 1963; 17(1): 208-12.
11. Bookout A.L., Cummins C.L., Mangelsdorf D.J., Pesola J.M., Kramer M.F. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. *Current protocols in molecular biology*. 2006; 15. 8. 1-8. 28. DOI: 10.1002/0471142727.mb1508s73
12. Mariappan I., Kacham S., Purushotham J., Maddileti S., Siamwala J., Sangwan V.S. Spatial distribution of niche and stem cells in ex vivo human limbal cultures. *Stem cells translational medicine*. 2014; sctm. 2014-0120.
13. Xie H-T., Chen S-Y., Li G-G., Tseng S.C. Isolation and expansion of human limbal stromal niche cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012; 53(1): 279-86.

14. Katikireddy K.R., Dana R., Jurkunas U.V. Differentiation potential of limbal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stem cells to corneal epithelial cells. *Stem Cells*. 2014; 32(3): 717-29.
15. Liang C-M., Weng S-J., Tsai T-H., Li I-H., Lu P-H., Ma K-H., et al. Neurotrophic and neuroprotective potential of human limbus-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2014; 16(10): 1371-83.
16. Haagdorens M., Van Acker S.I., Van Gerwen V., Ni Dhubghaill S., Koppen C., Tassignon M-J., et al. Limbal Stem Cell Deficiency: Current Treatment Options and Emerging Therapies. *Stem Cells International*. 2016; 2016: 22.
17. Saburina I.N., Repin V.S. 3D culturing: from individual cells to blastemic tissue (Revisited the phenomenon of epithelial-mesenchymal plasticity). *Geny i Kletki*. 2010; 5(2). (in Russian)
18. Maleki M., Ghanbarvand F., Reza Behvarz M., Ejtemaei M., Ghadirkhomi E. Comparison of Mesenchymal Stem Cell Markers in Multiple Human Adult Stem Cells. *International Journal of Stem Cells*. 2014; 7(2): 118-26.
19. Kosheleva N.V., Ilina I.V., Zurina I.M., Roskova A.E., Gorkun A.A., Ovchinnikov A.V., et al. Laser-based technique for controlled damage of mesenchymal cell spheroids: a first step in studying reparation in vitro. *Biology Open*. 2016. DOI: 10.1242/bio.017145
20. Repin V.S., Saburina I.N., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Zurina I.M., Kubatiev A.A. 3D-Technology of the Formation and Maintenance of Single Dormant Microspheres from 2000 Human Somatic Cells and Their Reactivation In Vitro. *Bull Exp Biol Med*. 2014; 158(1): 137-44.
21. Carlson B.M. *Human embryology and developmental biology*. Elsevier Health Sciences; 2013.
22. Krawchuk D., Honma-Yamanaka N., Anani S., Yamanaka Y. FGF4 is a limiting factor controlling the proportions of primitive endoderm and epiblast in the ICM of the mouse blastocyst. *Developmental biology*. 2013; 384(1): 65-71.
23. Warmflash A., Sorre B., Etoc F., Siggia E.D., Brivanlou A.H. A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells. *Nature methods*. 2014; 11(8): 847-54.
24. Nishimoto M., Fukushima A., Okuda A., Muramatsu M. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Molecular and cellular biology*. 1999; 19: 5453-65.
25. Lamouille S., Xu J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014; 15(3): 178.
26. Redmer T., Diecke S., Grigoryan T., Quiroga-Negreira A., Birchmeier W., Besser D. E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. *EMBO reports*. 2011; 12(7): 720-6.
27. Saburina I., Gorkun A., Kosheleva N., Semenova M., Pulin A., Repin V. Collation of the Conduct of Stromal Cells of Umbilical Funiculus and Multipotential of Stromal Cells of the Adult Marrow in 2-D and 3-D-Culture: Modeling of Stromal Regenerations. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2009; 16(4): 9-11. (in Russian)
28. Kubatiev A., Zurina I., Kosheleva N., Gorkun A., Saburina I., Repin V. From 2D Cell Phenotypes to 3D Live High-content Imaging: New Ways to Windows. *Journal of Cytology & Histology*. 2015; 6(6): 378.
29. Gorkun A., Saburina I., Kosheleva N., Zurina I., Pulin A., Shagidulin M. et al. Endothelial progenitor cells in umbilical cord-derived mesenchymal spheroids and their participation in the process of angiogenesis and vasculogenesis in acute liver failure. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2012; (4): 50-3. (in Russian)

Сведения об авторах:

Сабурина Ирина Николаевна, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП; профессор каф. общей патологии и патофизиологии ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России

Зурина Ирина Михайловна, мл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИ ОПП

Горкун Анастасия Алексеевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП

Борзенко Сергей Анатольевич, доктор мед. наук, проф., акад. РАЕН, руководитель центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова»

Никишин Денис Александрович, канд. биол. наук, науч. сотр. группы эмбриофизиологии ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН; вед. инженер каф. эмбриологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Колокольцова Тамара Дмитриевна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП; проф. каф. общей патологии и патофизиологии ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России

Устинова Екатерина Евгеньевна, мл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития; ФГБНУ НИИОПП

Репин Вадим Сергеевич, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, гл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития; ФГБНУ НИИОПП, проф. каф. общей патологии и патофизиологии ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России; гл. науч. сотр. лаборатории трансплантологии и клеточной биологии Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616.8.616.15

Шатохина С.Н.¹, Александрин В.В.², Кубатиев А.А.², Шабалин В.Н.²

Структуры сыворотки крови в интегральной оценке патофизиологических изменений в организме при экспериментальной ишемии головного мозга

¹ — ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» Минздрава России, 129110, Москва, ул. Щепкина, д. 61/2

² — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Цель исследования — выявить твердофазные структурные признаки в сыворотке крови крыс, указывающие на конкретные патофизиологические изменения в организме, вызванные экспериментальной ишемией головного мозга. **Методика.** Интегральную оценку патофизиологических изменений при ишемии головного мозга получали по твердофазным структурам сыворотки крови (СК) у 27 крыс-самцов Вистар массой 300—390 г. Обратимая ишемия мозга средней тяжести воспроизводилась билатеральной окклюзией общих сонных артерий на 15 мин с последующей реперфузией. Кровь (1 мл) забирали в пробирку Эппендорфа до ишемии, на 15-й мин ишемии и после 30 мин реперфузии. Методом клиновидной дегидратации получали фации (сухие плёнки) СК, структуры которой анализировали с помощью стереомикроскопа MZ-12 (Leica). Результаты исследований фиксировали по структурным параметрам СК до окклюзии, во время ишемии и через 30 мин после реперфузии. **Результаты.** До ишемии интегральная картина фаций СК крыс имела гармоничную системную организацию: радиальное или частично-радиальное расположение трещин, четко сформированные конкреции, что свидетельствовало о нормальном физиологическом состоянии экспериментальных животных. В период окклюзии сонных артерий появлялись маркеры ишемии, активации капиллярного кровотока, воспалительной реакции и стресса. Частично эти признаки сохранялись и при реперфузии. **Заключение.** Проведенные исследования структур СК на экспериментальных животных позволили выявить маркерные структуры СК, аналогичные выявленным при обследовании людей с ишемией головного мозга.

Ключевые слова: ишемия мозга; экспериментальные животные; сыворотка крови; метод клиновидной дегидратации; технология «Литос-система».

Для цитирования: Шатохина С.Н., Александрин В.В., Кубатиев А.А., Шабалин В.Н.

Структуры сыворотки крови в интегральной оценке патофизиологических изменений в организме при экспериментальной ишемии головного мозга. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 168—173.

Для корреспонденции: Шатохина Светлана Николаевна, доктор мед. наук, проф., руководитель клинко-диагностической лабораторией, e-mail: sv_n@list.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.05.2016

Shatokhina S.N.¹, Aleksandrin V.V.², Kubatiev A.A.², Shabalin V.N.²

Blood serum structures integrated assessment of pathophysiological changes in experimental cerebral ischemia

¹ — Moscow Regional Research and Clinical Institute by name M.F. Vladimirovskiy, 61/2, ul. Chepkina, Moscow, 129110, Russia

² — Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, ul. Baltiyskaya, Moscow, 125315, Russia

The purpose. To reveal solid-phase structures of blood serum during and after experimental cerebral ischemia. **Methods.** Integrated estimation pathophysiological changes at brain ischemia received on solid-phase structures of blood serum (BS) at 27 rats-male Vistar in weight of 300—390 g. Reversible brain ischemia of moderate severity was reproduced imposing surgical clips on both common carotids for 15 minutes then clips removed and provided bloodstream restoration on carotids. Blood took away in Eppendorf's test tube in volume on 1 ml before imposing clips, directly ahead of their removal and in 30 minutes after bloodstream restoration. By the Method cuneiform dehydration received BS facia (dry a film) which structures analyzed by means of stereomicroscope MZ12 firm «Leica». Results of researches fixed on structural parameters BS before imposing clips, after removal clips and in 30 minutes after bloodstream restoration. **Results.** Before ischemia the integrated picture facias BS rats had the harmonious system organisation: the radial or partially-radial arrangement of the

cracks, accurately generated konkrecias that testified to normal physiological condition of experimental animals. During the period occlusions carotids there were markers of a ischemia, activation of a capillary blood-groove, inflammatory reaction and stress. Partially these signs remained at reperfusion. **Conclusion.** The conducted researches of structures BS on experimental animals have allowed to reveal marker structures BS similar revealed at inspection of people with an ischemia of a brain.

Keywords: brain ischemia; experimental animals; blood serum; method cuneiform dehydration; technology «Litos-system».

For citation: Shatokhina S.N., Aleksandrin V.V., Kubatiev A.A., Shabalin V.N. Blood serum structures integrated assessment of pathophysiological changes in experimental cerebral ischemia. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2016; 60 (4): 168—173. (in Russ.).

For correspondence: Svetlana N. Shatokhina, Doctor of Medical Sciences, Leading Researcher work Moscow Regional Research and Clinical Institute by name M.F. Vladimirskiy, 61/2, ul. Chepkina, Moscow, 129110, Russian Federation, e-mail: sv_n@list.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 12.05.16

Введение

Традиционно в оценке состояния организма экспериментальных животных используются аналитические методы исследования биологических жидкостей, которые нацелены на определение в них количественного содержания определенных компонентов (общий белок, холестерин, ферменты, гормоны и пр.) [1]. Это сотни различных показателей, частично отражающих то или иное функциональное состояние органов и систем, однако общее информационное поле, формируемое взаимосвязями между этими показателями, установить не удаётся. Вместе с тем, сыворотка крови (СК) содержит весь комплекс биохимических компонентов, наработанных всеми клетками организма, и несёт в себе интегральную информацию о его патофизиологическом состоянии. Однако эти компоненты в жидкой фазе СК имеют между собой слабые, крайне неустойчивые связи. Разработанная нами технология самоорганизации биологической жидкости путём её перевода в твёрдую фазу — «Литос-система» [2], делает эти связи устойчивыми, а формируемые ими структуры — доступными для визуального анализа. Х. Бернал (1969) справедливо заметил, что «биологические системы обладают универсальной способностью сохранять и передавать информацию в виде структур и функций» [3].

«Литос-система», положенная в основу проведенных нами исследований, позволяет получать интегральную картину межмолекулярных взаимодействий, которые определяют информационные связи, управление и обеспечение энергетическими и пластическими ресурсами всех жизненно важных процессов организма. К настоящему времени с помощью «Литос-системы» выявлены многие морфологические структуры, отражающие физиологический статус организма человека и позволяющие диагностировать

различные патологические состояния: интоксикацию, ишемию, воспаление, злокачественный рост, аномальную биокристаллизацию и другие. Технология «Литос-система» разрешена для практического применения (Разрешение ФС № 155 от 2009 г.).

Цель исследования — оценить интегральную картину гомеостаза и выявить твердофазные структурные признаки в СК крыс, указывающие на конкретные патофизиологические изменения в организме, вызванные экспериментальной ишемией головного мозга.

Методика

Эксперименты выполнены на 27 половозрелых крысах-самцах Вистар массой 300—390 г. Животных содержали в виварии в стандартных условиях освещения и питания, при свободном доступе к корму и питьевой воде. Опыты проведены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Международных правилах обращения с экспериментальными животными (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; NIH Publication № 85-23,1996). Животных наркотизировали хлоралгидратом (300 мг/кг, внутривенно). Глубину наркоза оценивали по исчезновению болевой реакции и роговичного рефлекса. Животное дышало самостоятельно. Температура тела поддерживалась на уровне 37°C. Для взятия крови в бедренную артерию вставляли полиэтиленовый катетер. У животного выбривали шерсть на шее, операционное поле протирали спиртом, на вентральной поверхности шеи делали срединный надрез и пинцетом отодвигали грудино-подъязычную мышцу. Общие сонные артерии осторожно отделяли от вагосимпатического ствола и брали на лигатуру. Место операции закрывали тампоном, а рану ушивали до минимальных размеров. Животное помещали в стереотаксический станок с жест-

кой фиксации головы. Временная ишемия мозга средней тяжести воспроизводилась наложением хирургических клипс (Yasargil microaneurysm clips, FD 681, Aescular-Werke AG, Tuttlingen F.R.G.) на обе общие сонные артерии на 15 мин, после чего зажимы снимали и обеспечивали восстановление кровотока по сонным артериям. В конце эксперимента животным вводили летальную дозу наркоза.

Кровь забирали в пробирку Эппендорфа в объёме по 1 мл до наложения клипс, непосредственно перед их снятием и через 30 мин после восстановления кровотока (реперфузии). После свёртывания крови сыворотку отделяли от сгустка и переносили в другую пробирку.

Использовали метод клиновидной дегидратации. На предметное стекло, расположенное строго горизонтально, наносилась капля СК в объёме 20 мкл. Капля высыхивалась при температуре 20—25°C и относительной влажности 55—60% при неподвижности окружающего воздуха. Продолжительность периода высыхания составляла 18—24 ч. Исследование структурообразующих элементов дегидратированной капли проводилось с помощью стереомикроскопа MZ12 фирмы «Leica». Сущность метода заключается в том, что при испарении воды в капле биологической жидкости, лежащей на плоскости, происходит распределение растворённых в ней веществ по площади в соответствии с их осмотической активностью, гидрофильностью, молекулярным весом, агрегатным состоянием и другими физико-химическими параметрами [2]. В результате получали фации (от лат. *facies* — образ) — сухие плёнки из свежеполученной СК и спустя 24 ч хранения ее в пробирке при температуре +5°C (период завершения биохимических процессов). Анализ структурообразующих элементов фаций проводился в трех режимах: системная организация фаций (обычная микроскопия, увеличение 15-крат), локальная организация фаций

(обычная микроскопия, увеличение 60-крат) и локальная организация фаций (микроскопия в частичном-темном поле, увеличение 60-крат). Результаты исследований фиксировали по структурным параметрам СК до наложения клипс, перед снятием клипс и через 30 мин после восстановления кровотока. В настоящем сообщении приводятся результаты картин фаций СК, полученных после завершения биохимических процессов в экстракорпоральной СК (24 ч хранения при 5°C), так как в данном состоянии биологическая жидкость несёт в себе более устойчивую информацию.

Новые термины, используемые в статье:

- конкреция — шаровидный (иногда как бы сплюснутый, неправильно округленный) минеральный агрегат радиально-лучистого строения;
- волновой пакет — определённая совокупность волн, обладающих разными частотами, которые описывают обладающую волновыми свойствами информацию, в общем случае ограниченную во времени и пространстве.

Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия χ^2 .

Результаты и обсуждение

До ишемии мозга интегральная картина фаций СК крыс имела однотипную системную организацию (рис. 1 а): радиальная симметрия основных трещин (рис. 1 а, стрелки 1), хорошо сформированные конкреции (рис. 1 а, стрелки 2), мелкие отдельности, замкнутые в центре фации (рис. 1 а, стрелки 3). Эти признаки свидетельствовали о нормальном физиологическом состоянии организма [3]. Общие данные об изменениях структуры фаций СК крыс в процессе эксперимента представлены в таблице.

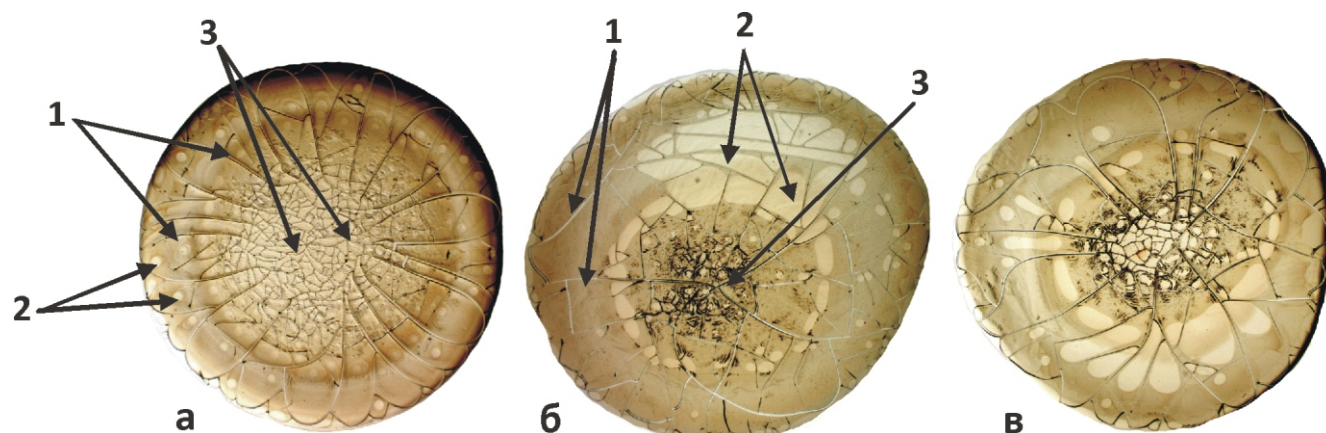


Рис. 1. Изменение системной организации фаций сыворотки крови крысы в ходе эксперимента: а — до ишемии мозга; б — сразу после начала ишемии мозга; в — через 30 мин реперфузии. Ув. 15-крат. Пояснения в тексте.

Данные таблицы свидетельствуют о выраженных различиях в частоте формирования патологических структур в фациях СК при ишемии мозга. В конце периода ишемии у большинства крыс отмечали нарушение радиальной симметрии и увеличение ширины части трещин, появление несформированных конкреций, что указывало на изменение межмолекулярных связей. Эти изменения в период реперфузии исчезали полностью или сохранялись в СК незначительной части животных (несформированные конкреции). У большинства крыс при ишемии появился маркер интоксикации (токсические бляшки), который сохранялся в период реперфузии. В конце периода ишемии у всех крыс выявлен маркер ишемии (серповидные образования), маркер активации капиллярного кровотока (штриховые трещины), маркер воспалительной реакции (языковые структуры) и маркер стресса (волновой пакет). Эти изменения, кроме маркера стресса, были устойчивыми и сохранялись в период реперфузии. В период ишемии выявлялся маркер снижения артериального давления (обратные гребешковые структуры), который сохранялся и в период реперфузии. В качестве примера на рис. 1 б представлены типичные изменения структуры фаций СК одной из крыс в ответ на ишемию. Эти изменения характеризовались нарушением радиальной симметрии и увеличением ширины части трещин (рис. 1 б, стрелки 1); множеством несформированных конкреций (рис. 1 б, стрелки 2); скоплением мелких штриховых трещин в центре фации — признак компенсаторной активации микроциркуляторного русла (рис. 1 б, стрелка 3).

В состоянии реперфузии системная организация фаций СК восстанавливалась до частично-радиальной симметрии, однако часть конкреций оставалась недооформленной, центр фации заполняли четко

сформированные конкреции, а количество штриховых трещин уменьшилось (рис. 1 в).

Анализ локальных структур в фациях СК показал, что реакция организма на ишемию выражалась появлением в структуре фации маркеров ряда патологических состояний: воспаления (волновые пакеты с языковыми структурами), снижения артериального давления (обратные гребешковые структуры) и компенсаторной активации микроциркуляторного русла в виде множественных штриховых трещин (рис. 2 б). Эти признаки указывали на стрессовую реакцию. При реперфузии признаки стрессовой реакции не определялись, однако можно было обнаружить языковые структуры, штриховые, гребешковые трещины и токсические бляшки (рис. 2 в).

При микроскопии фаций СК в частично-темном поле в условиях ишемии и при реперфузии у всех крыс в различной степени выраженности определялись следующие патологические признаки: ишемии — в виде серповидных образований, интоксикации — в виде токсических бляшек и «морщин» в краевой зоне. При ишемии эти признаки определялись в большем количестве по сравнению с состоянием реперфузии (рис. 3).

Следует отметить, что структуры фаций СК у разных крыс до ишемии имели некоторое разнообразие, однако описанные и представленные на рисунках структурные особенности фаций в условиях ишемии и реперфузии были закономерными у всех крыс, что могло свидетельствовать о возникновении ряда однотипных элементов реакции организма животных на ишемию головного мозга.

Полученные данные согласуются с результатами исследований, в которых осуществляли регистрацию локального кровотока в процессе экспериментальной ишемии головного мозга средней тяжести у крыс [4—7, 8].

Таблица

Динамика структурных показателей фаций сыворотки крови крыс в процессе эксперимента

Патологические структуры фаций сыворотки крови (n = 27)	Периоды исследования			Статистическая значимость: P ₁ (I—II периоды); P ₂ (II—III периоды)
	I — до ишемии	II — в период ишемии	III — в период реперфузии	
Нарушение радиальной симметрии основных трещин	0	21 (77,8%)	0	
Увеличение ширины части трещин	0	21 (77,8%)	0	
Несформированные конкреции	0	16 (59,3%)	7 (25,9%)	p ₂ <0,05
Серповидные образования	0	27 (100,0%)	27 (100,0%)	
Языковые структуры	5 (18,5%)	27 (100,0%)	27 (100,0%)	p ₁ <0,02
Волновой пакет	0	27 (100,0%)	0	
Обратные гребешковые структуры	0	15 (55,6%)	12 (44,4%)	
Штриховые трещины в центре фации	2 (7,4%)	27 (100,0%)	27 (100,0%)	p ₁ <0,01
Токсические бляшки	0	21 (77,8%)	19 (70,4%)	

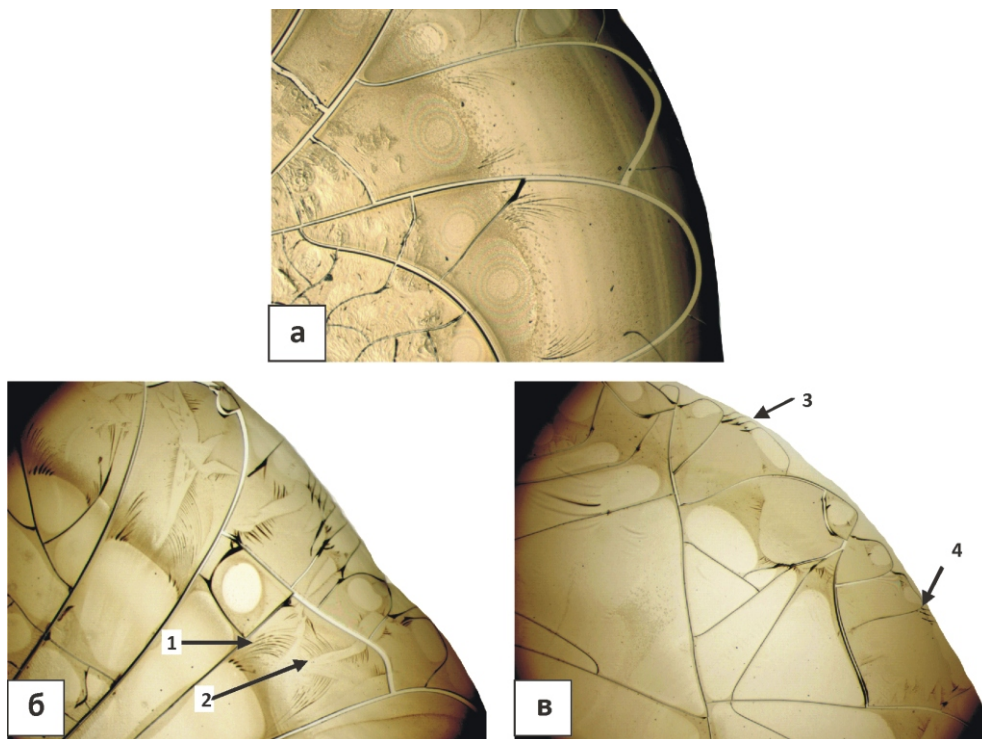


Рис. 2. Локальные изменения организации фаций сыворотки крови крысы в ходе эксперимента: а — до ишемии мозга; б — сразу после начала ишемии мозга; в — через 30 мин реперфузии: 1 — волновой пакет; 2 — языковые структуры; 3 — обратные гребешковые трещины; 4 — штриховые трещины. Микроскопия в обычном свете. Ув. 60-крат.

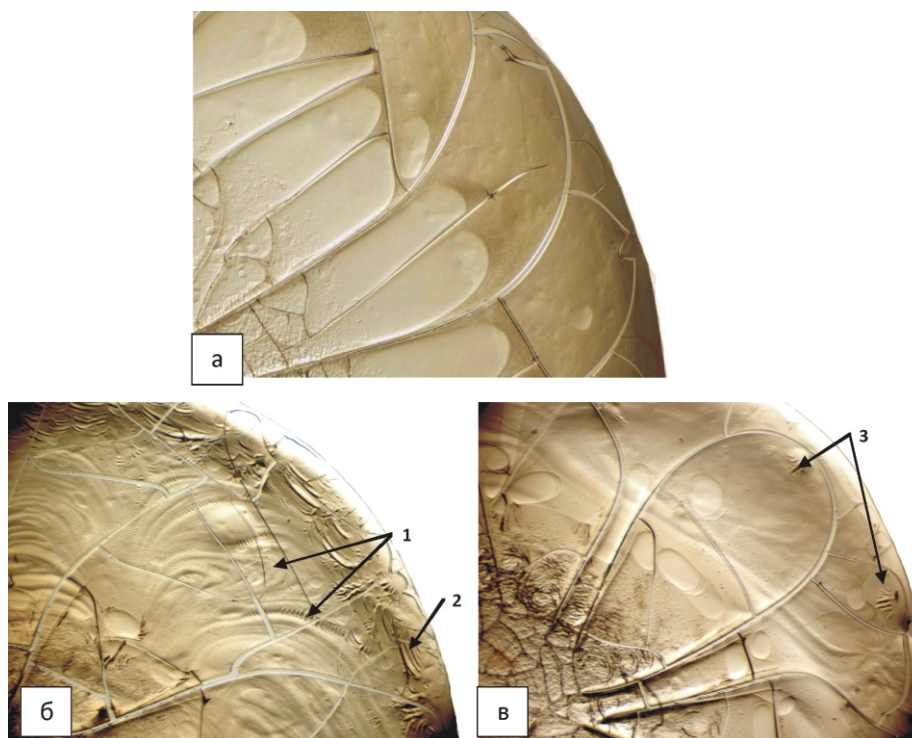


Рис. 3. Локальные изменения организации фаций сыворотки крови крысы в ходе эксперимента: а — до ишемии мозга; б — сразу после начала ишемии мозга; в — через 30 мин реперфузии: 1 — серповидные образования; 2 — «морщины»; 3 — «токсические бляшки». Микроскопия в частично-темном поле. Ув. 60-крат.

При этом в период ишемии мозга отмечали значительное снижение мозгового кровотока: до 54% по сравнению с исходным состоянием (100%). На фоне восстановления кровотока наблюдалось его неполное восстановление по сравнению с исходным уровнем: до 76 %, то есть проявлялась постишемическая гипоперфузия. Срыв ауторегуляции мозгового кровотока в ответ на снижение перфузионного артериального давления сопровождался торможением белкового синтеза, началом анаэробного гликолиза, снижением рН ткани мозга, началом дилатации пиальных артериол за счет метаболического фактора, лактат-ацидоза, цитотоксическим отеком.

Таким образом, проведенные исследования структур СК на экспериментальных животных позволили выявить маркерные структуры СК, аналогичные выявленным при обследовании людей с ишемией головного мозга [2, 3]. Используемая методика является технически простой, не требует дорогостоящего оборудования и позволяет получать ценный диагностический материал на основе оценки интегральной картины фазы СК и её локальных структур, служащих показателями патологических изменений в организме подопытных животных в процессе различных экспериментальных воздействий.

Выводы

1. Ишемия головного мозга опытных животных при билатеральной окклюзии общих сонных артерий вызывает значительные изменения в структуре твёрдой фазы СК, а именно появление маркёров: воспаления и ишемии, снижения перфузионного артериального давления, активации капиллярного кровотока в тканях головного мозга, интоксикации организма.

2. При реперфузии, возникшие в результате ишемии некоторые изменения в структуре твёрдой фазы СК исчезают, в том числе признаки стрессовой реак-

ции. Однако на фоне интоксикации продолжается ответная воспалительная реакция организма, признаки ишемии тканей головного мозга и активация капиллярного кровотока. Такая картина значительно отличается от фонового состояния, что свидетельствует о постишемическом выбросе в кровь значительного количества продуктов незавершенного метаболизма.

References

1. Ushkov B.G., Chereshev V.A. *Concept of norm of physiology (physiological constants of laboratory animals). [Ponyatie normy v fyziologii (fiziologicheskie konstanty laboratornykh zhivotnykh)]*. Moscow; NP «Tsentr strategicheskogo partnerstva»; 2016. (In Russian)
2. Shabalin V.N., Shatokhina S.N. *Morphology biological liquids of man [Morfologiya biologicheskikh zhdkostey cheloveka]*. Moscow; Khrizostom, 2001. (In Russian)
3. Shatokhina S.N., Shabalin V.N. *Atlas of structures not cellular tissues of man in norm and pathology. Vol. 2. Morphological structures of of blood serum [Atlas struktur nekletochnykh tkaney cheloveka v norme i patologii]*. Tver; Triada; 2013. (in Russian)
4. Aleksandrin V.V., Aleksandrov P.N., Khugaeva V.K. *Effect of adrenoblocers on the cerebral microvessels reactivity in ischemia. [Vliyaniye adrenoblokatorov na reaktivnosty mikrosovodov mozga pri ishemii. Itogi nauki i tekhniki. Farmakologiya mozgovogo krovoobrashcheniya]*. Moscow; VINITI, 1991; Vol. 26: 105-11. (In Russian)
5. Aleksandrin V.V. Autoregulation of cerebral blood flow in normal and during postischemic hypoperfusion. *Patogenez*. 2012; 10(1): 27-30. (in Russian)
6. Aleksandrin V.V., Kozevnikova E.N. Early postischemic disorders cerebral blood flow: no-reflow and delayed hypoperfusion. *Patogenez*. 2014; 12(2): 27-31. (in Russian)
7. Aleksandrin V.V. Ischemic thresholds of the brain blood flow. *Aktualnye problemy sovremennoy nauki*. 2015; 2: 70-2. (in Russian)
8. Mackensen G.B., Nellgard B., Kudo M., Sheng H., Pearlstein R.D., Warner D.S. Periischemic cerebral blood flow (CBF) does not explain beneficial effects of isoflurane on outcome from near-complete forebrain ischemia in rats. *Anesthesiology*. 2000; 93(4): 1102-6.

Сведения об авторах:

Александрин Валерий Васильевич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. регуляции агрегатного состояния крови, e-mail: alexandrin-54@mail.ru

Кубатиев Аслан Амирханович, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, науч. руководитель НИИ общей патологии и патофизиологии

Шабалин Владимир Николаевич, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, глав. науч. сотр. лаб. биокристалломики, e-mail: shabalin.v2011@mail.ru

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616-092

Иванов Ю.Д.¹, Мальсагова К.А.¹, Плешакова Т.О.¹, Веснин С.Г.², Татур В.Ю.³, Ярыгин К.Н.¹

Мониторинг яркостной температуры суспензии клеток фолликулярной карциномы щитовидной железы в СВЧ-диапазоне с помощью радиотермометрии

¹ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», 119121, Москва, Погодинская ул. д. 10

² — ООО «Фирма РЭС», 105082, Москва, Большая Почтовая ул., д. 22

³ — Фонд перспективных технологий и новаций, 115682, Москва, Шипиловская ул., д. 64, 1, 147

Цель исследования — мониторинг яркостной температуры в СВЧ-диапазоне суспензии клеток фолликулярной карциномы щитовидной железы в процессе некроза этих клеток. **Методика.** Объектом исследования служили клетки фолликулярной карциномы щитовидной железы, переведенной в суспензию с помощью раствора Версена и 0,25%-ного раствора трипсина. Клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в ростовой среде. Проводился мониторинг изменения соотношения величин яркостных температур $T_{\text{СВЧ}}$ и $T_{\text{ИК}}$ в процессе некроза клеток. Измерения яркостных температур проводились при помощи радиотермометра. СВЧ-диапазон составлял 3,4—4,2 ГГц, ИК-диапазон составлял 8—13 мкм. Температура суспензии поддерживалась на уровне 37,5°C. **Результаты.** Показано, что при некрозе в суспензии клеток происходит повышение яркостной температуры раствора в диапазоне 3,4—4,2 ГГц (СВЧ-диапазон), в то время как яркостная температура среды в ИК-диапазоне не меняется. **Заключение.** В процессе некроза происходит изменение неравновесного состояния клеточной среды, что выражается в изменении соотношения $T_{\text{СВЧ}}$ и $T_{\text{ИК}}$. В процессе протекания некроза клеток яркостная температура $T_{\text{СВЧ}}$ возрастает. При этом яркостная температура в ИК-диапазоне остается на одном уровне.

Ключевые слова: СВЧ-излучение; фолликулярная карцинома щитовидной железы; радиотермометрия.

Для цитирования: Иванов Ю.Д., Мальсагова К.А., Плешакова Т.О., Татур В.Ю., Ярыгин К.Н. Мониторинг яркостной температуры суспензии клеток фолликулярной карциномы щитовидной железы в СВЧ-диапазоне с помощью радиотермометрии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 174—177.

Для корреспонденции: Иванов Юрий Дмитриевич, доктор биол. наук, проф., руководитель лаб. нанобиотехнологии ИБМХ, e-mail: yurii.ivanov@rambler.ru

Финансирование. Работа была выполнена при поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013—2020 годы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.04.2016

Ivanov Yu.D.¹, Malsagova K.A.¹, Pleshakova T.O.¹, Vesnin S.G.², Tatur V.Yu.³, Yarygin K.N.¹

Monitoring of brightness temperature of suspension of follicular thyroid carcinoma cells in SHF range by radiothermometry

¹ — Institute of Biomedical Chemistry, 10, ul. Pogodinskaya, Moscow, 119121, Russia

² — RES Ltd., 22, ul. B. Pochtovaya, Moscow, 105082, Russia

³ — Foundation of Perspective Technologies and Novations, 64 build. 1, ul. Shipilovskaya, Moscow, 115682, Russia

The purpose of this research consisted in monitoring of brightness temperature of the suspension of follicular thyroid carcinoma cells during the necrosis of these cells in superhigh frequency (SHF) range. **Methods.** The monitoring of the change in the ratio between brightness temperatures T_{SHF} and T_{IR} values during the necrosis of these cells. The object of study was follicular thyroid carcinoma cells suspension prepared with use of Versene solution and 0.25% trypsin solution. The cells were precipitated by centrifugation and re-suspended in culture medium. The measurements of brightness temperatures were carried out with use of radiothermoimeter. SHF range was 3.4—4.2 GHz, and infrared (IR) range was 8—13 μm . The temperature of the suspension was maintained at 37.5°C. **Results.** It was found that upon the necrosis in the suspension of cells, an increase in brightness temperature in 3.4—4.2 GHz range (SHF range) occurs, while brightness temperature of the medium in the IR range does not change. **Conclusion.** The monitoring of necrosis of follicular thyroid carcinoma cells was carried out by SHF-radiothermometry. It was shown that during the necrosis the change of non-equilibrium state of cell medium occurs, that results in the change in the ratio between T_{SHF} and T_{IR} . During the necrosis, the brightness temperature in SHF range (T_{SHF}) increases.

Keywords: SHF emission; follicular thyroid carcinoma; radiothermometry.

For citation: Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Pleshakova T.O., Tatur V.Yu. Monitoring of brightness temperature of suspension of follicular thyroid carcinoma cells in SHF range by radiothermometry. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (4): 174—177. (in Russ.)

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.

Funding. The work was performed in the framework of the Program for Basic Research of State Academies of Sciences for 2013—2020.

Information about authors:

Ivanov Yu.D., <http://orcid.org/0000-0001-5041-1914>

Pleshakova T.O., <http://orcid.org/0000-0003-3217-9095>

Received 10.04.2016

Введение

В последнее десятилетие наблюдается существенный рост количества онкологических заболеваний, около 5 млн чел. ежегодно умирает от злокачественных опухолей. Растет число новых случаев рака щитовидной железы, второй по встречаемости рак щитовидной железы — фолликулярная карцинома (~15%).

Важное значение в профилактике и лечении онкозаболеваний имеет разработка новых методов диагностики, включая методы мониторинга клеточных процессов. Спектральные методы клеточного мониторинга относятся к неинвазивным методам, и поэтому, находят широкое распространение в настоящее время. Среди оптических методов мониторинга клеточных процессов можно выделить методы, основанные на использовании Раман-спектроскопии [1]. Эти методы имеют высокий потенциал для исследования концентраций клеточных компонентов в процессе клеточного цикла по анализу колебательных мод. Эти моды находятся в диапазоне сотен-тысяч см⁻¹.

В последнее время появились методы когерентной спектроскопии четырехфотонного рассеяния (ЧФР), позволяющие исследовать свойства биологических объектов. Регистрация оптических переходов в области $\nu_1 - \nu_2 \sim 0,1—100$ см⁻¹ дает возможность регистрировать низкочастотную область спектра, за счет фазирования в макроскопическом объеме молекулярных движений с помощью двух лазерных волн с частотами ν_1 и ν_2 . Разность этих величин ($\nu_1 - \nu_2$) сканируется в широкой области спектра от ближнего ИК- до микроволнового диапазона [2]. Диапазон частот 0,1—100 см⁻¹, соответствующий вращательным переходам воды и находящийся в микроволновом диапазоне, был исследован для водных растворов белков и ДНК [2, 3].

Микроволновый диапазон частот биологических объектов может исследоваться также с помощью прямой микроволновой спектроскопии. Микроволновая спектроскопия начинает использоваться для исследования тканей человека [4]. Микроволновые радиометры находят свое применение в создании новых диагностических устройств, работающих в микроволновом диапазоне [<http://www.google.com/pa->

[tents/WO2010074608A3?hl=ru&cl=ru](https://doi.org/10.1007/978-3-642-10074-6_8)]. Недавно нами было обнаружено, что механическое возбуждение воды и белковых растворов приводит к генерации заряда [5] и к генерации СВЧ-излучения [6, 7]. Также было показано, что функционирование ферментов связано с флуктуациями белковой глобулы [8], что, в свою очередь, сопровождается микроволновым излучением в области 3,4—4,2 ГГц [9, 10].

Цель исследования — мониторинг некроза клеток с помощью микроволновой радиометрии. Было показано, что при вводе суспензии клеточной линии в измерительную ячейку при некрозе клеток яркостная температура $T_{\text{СВЧ}}^{\text{cell}}$ повышается.

Методика

Клеточные культуры и приготовление образцов

Клеточная линия фолликулярной карциномы щитовидной железы человека (линия FTC-133) культивировалась по стандартной методике в культуральных флаконах 75 мл с фильтрами (Corning, США) в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂, 80% влажность). Технологические возможности были любезно предоставлены лабораторией проф. К.Н. Ярыгина (ИБМХ). Состав ростовой среды для линии: DMEM/F12 (GIBCO, США); 10% FBS (фетальная бычья сыворотка) (GIBCO, США). Смену среды осуществляли 2 раза в неделю. При достижении 80%-ной конfluence клетки переводили в суспензию с использованием раствора Версена (ПанЭко, Россия) и 0,25%-ного раствора трипсина (ПанЭко, Россия) (1:1). Клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в вышеупомянутой ростовой среде.

Схема проведения измерений

Непосредственно до измерений 1 мл образца суспензии культуры клеток инкубировали в термостате. Затем образец суспензии культуры клеток помещали в термостатированную кювету на водяной бане, температура которой поддерживалась постоянной $T = 37,5^\circ\text{C}$. После этого, проводилась дополнительная инкубация в течение 5 мин для записи базовой линии инфракрасного

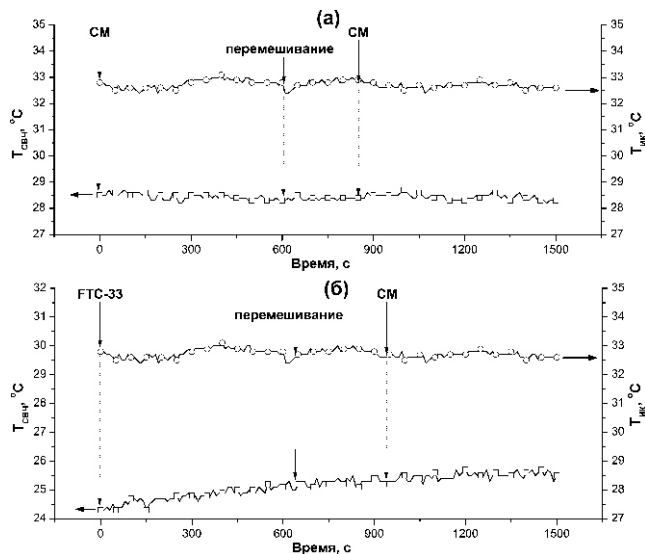
излучения, после чего измерялось инфракрасное излучение суспензии клеток для регистрации начальной яркостной температуры среды в инфракрасном диапазоне $T_{ИК}$ в диапазоне 8—10 мкм. После этого проводился мониторинг яркостной температуры в суспензии культуры клеток в СВЧ-диапазоне $T_{СВЧ}$ в диапазоне 3,4—4,2 ГГц в течение 1500 с (25 мин).

После окончания экспериментов осуществляли повторное измерение яркостной температуры $T_{ИК}$ в этом диапазоне. Контрольные измерения $T_{СВЧ}$ и $T_{ИК}$ проводили со средой, не содержащей культуры клеток, по аналогичной схеме.

Подсчет клеток осуществляли с использованием камеры Горяева, в котором использовалось окрашивание мертвых клеток с помощью трипанового синего [11]. Метод основан на способности красителя проникать в клетки через поврежденные мембраны мертвых клеток. Процентное содержание доли погибших и живых клеток вычислялось из отношения количества этих клеток, подсчитанных в камере Горяева.

Измерение $T_{СВЧ}$ и $T_{ИК}$ излучения раствора

Используемый в нашей работе радиометр RTM-01 RES (Россия) измеряет электромагнитное излучение среды. Измерения в СВЧ-диапазоне ($T_{СВЧ}$) проводились при частотах 3,4—4,2 ГГц. В случае измерения в инфракрасном диапазоне 8—13 мкм, регистрировалась яркостная температура $T_{ИК}$.



Зависимость яркостной температуры ($T_{СВЧ}$) раствора в измерительной кювете от времени инкубации:

(а) контрольные измерения $T_{СВЧ}$ в растворе, не содержащем клеток; (б) измерения $T_{СВЧ}$ в суспензии клеток. Экспериментальные условия: суспензия клеточной линии FTC-133 в ростовой среде (СМ) — растворе DMEM/F12, содержащем 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS). Температура инкубации $T = 37,5^{\circ}\text{C}$. Стрелками указано перемешивание и добавление 10 мкл ростовой среды.

Для регистрации излучения в СВЧ-диапазоне использовалась штыревая антенна, соединенная с радиотермометром, которая погружалась в раствор образца, помещенный в измерительную кювету. Полученные данные измерений, представленные в единицах яркостной температуры $T_{СВЧ}$ и $T_{ИК}$, в которых градуирован радиотермометр RTM-01 RES. Точность измерения составляла $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Данные измерения приводятся в виде зависимости $T_{СВЧ}$ и $T_{ИК}$ от времени.

Термодинамическая температура раствора измерялась термометром и поддерживалась на уровне $37,5^{\circ}\text{C}$.

Результаты и обсуждение

Мониторинг измерения яркостной температуры в СВЧ-диапазоне

Вначале были проведены контрольные эксперименты для измерения яркостных температур $T_{ИК}$ и $T_{СВЧ}$ контрольных сред. В качестве таких контрольных сред были использованы питательные среды, на которых культивировались эти клетки. Полученные результаты представлены на рисунке. Как видно из рисунка, $T_{ИК}$ и $T_{СВЧ}$ растворов не менялись в период наблюдения. Причем, этот уровень не изменялся при перемешивании раствора или при отборе и добавлении 200 мкл этого раствора. Стабильность сигнала $T_{СВЧ}$ и $T_{ИК}$ находилась на уровне $0,5^{\circ}\text{C}$. $T_{СВЧ}$ растворов составляла $28,1—28,5^{\circ}\text{C}$, а $T_{ИК} = 32,5—33,0^{\circ}\text{C}$.

Далее проводились эксперименты по измерению $T_{ИК}$ и $T_{СВЧ}$ суспензии клеток. Данные приведены на рис. 1, б. Было показано, что в начальный период времени наблюдается подъем $T_{СВЧ}$ в течение 1500 с с $24,3$ до $25,7^{\circ}\text{C}$, т.е. $\Delta T_{СВЧ}$ составило $1,4^{\circ}\text{C}$. Такого подъема не наблюдалось в контрольных экспериментах. Уровень $T_{ИК}$ клеточной среды в начале эксперимента составлял $T_{ИК} = 32,7^{\circ}\text{C}$, а после эксперимента практически не изменялся и составлял $T_{ИК} = 32,3^{\circ}\text{C}$, что находилось в пределах погрешности экспериментов. То есть, яркостная температура $T_{ИК} = 32,5^{\circ}\text{C}$ существенно не изменилась в течение времени эксперимента.

Измерения количества некротических клеток, образовавшихся после 25 мин инкубации суспензии клеточной линии в условиях эксперимента, показали, что их количество возросло и составило $\sim 50\%$.

Таким образом, в процессе измерений зарегистрировано повышение яркостной температуры $T_{СВЧ}$ в процессе некроза клеток при сохранении уровня $T_{ИК}$.

В суспензии, в отсутствие поддержания специальных условий (контроль pH, степень буферизации, концентрации кислорода) нормальное функционирование клетки может протекать в течение 20—30 мин, после чего может происходить некроз клеток [http://www.stormoff.ru/articles_565_76.html]. В представленной работе, были проведены измерения в течение 1500 с (~ 25 мин). При этом

наблюдалась пониженная яркостная температура суспензии этих клеток в СВЧ-диапазоне $T_{\text{СВЧ}} = 24,3^{\circ}\text{C}$, а яркостная инфракрасная температура была на уровне $T_{\text{ИК}} \sim 32^{\circ}\text{C}$. Пониженная температура $T_{\text{СВЧ}}$ обусловлена, возможно, неоптимизированным согласованием измерительного тракта с СВЧ-антенной. Как было отмечено выше, без поддержания специальных условий осуществление жизнедеятельности клеток затруднительно, и должно приводить к их некрозу. Действительно, как показали измерения, в камере Горяева, наблюдался некроз клеток до 50% от общего количества через 20 мин после начала инкубации суспензии в измерительной ячейке. При этом, наблюдалось повышение $T_{\text{СВЧ}}$ с 24,3 до 25,7 $^{\circ}\text{C}$, на $\Delta T_{\text{СВЧ}} = 1,4^{\circ}\text{C}$. Таким образом, при некрозе клеток наблюдается повышение $T_{\text{СВЧ}}$ -среды, в то время как ИК-среды существенно не менялось.

Как нами отмечалось ранее, при функционировании ферментов возникает неравновесное состояние среды и СВЧ-излучение белковых растворов [9, 10]. В данной работе показано, что при функционировании клетки протекают также процессы, приводящие к неравновесному состоянию среды, выражающемуся в изменении соотношений $T_{\text{СВЧ}}$ к $T_{\text{ИК}}$. Этот эффект может быть связан с перестройкой клеток, ее водной структуры (как внутриклеточной, так и межклеточной). Разработанный подход мониторинга некроза клеток по контролю разности яркостных температур клеток в СВЧ и ИК-диапазонах может быть использован для контроля динамики патологических процессов, сопровождающихся некрозами.

Таким образом, при мониторинге некроза клеток линии карциномы цитовидной железы с помощью СВЧ-радиотермометрии, показано, что в процессе некроза происходит изменение неравновесного состояния клеточной среды, что выражается в изменении соотношения $T_{\text{СВЧ}}$ и $T_{\text{ИК}}$. В процессе некротизирования клеток яркостная температура $T_{\text{СВЧ}}$ возрастает. При этом яркостная температура в ИК-диапазоне остается на одном уровне.

Сведения об авторах:

Мальсагова Кристина Ахмедовна, мл. науч. сотр. лаб. нанобиотехнологии ИБМХ

Плешакова Татьяна Олеговна, старший научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ

Веснин Сергей Георгиевич канд. техн. наук, доцент, генеральный директор ООО «Фирма РЭС»

Татур Вадим Юрьевич, исполнительный директор, Фонд перспективных технологий и новаций

Ярыгин Константин Никитич, член-корр. РАН ИБМХ

References

- Huang Ch.-K., Ando M., Hamaguchi H.O., Shigeto S. Disentangling dynamic changes of multiple cellular components during the yeast cell cycle by in vivo multivariate Raman imaging. *Anal. Chem.* 2012; 84: 5661-8.
- Bunkin A.F., Pershin S.M. Coherent laser spectroscopy of the processes of hydration of biomolecules and nanoparticles. *Trudy instituta obshchey fiziki im. A.M. Prokhorova.* 2013; 69: 58-69. (in Russian)
- Bunkin A.F., Pershin S.M., Nurmatov A.A. Four-photon spectroscopy of ortho/para spin-isomer H_2O molecule in liquid water in sub-millimeter range. *Laser Phys. Lett.* 2006; 3(6): 275-7.
- Betskii O.V., Kislov V.V., Lebedeva N.N. *Millimeter waves and living systems [Millimetrovye volny i zhivye sistemy]*. Moscow: Sains-Press; 2004. (in Russian)
- Ivanov Y.D., Pleshakova T., Malsagova K., Kozlov A., Kaysheva A., Kopylov A., Izotov A., Andreeva E., Kanashenko S., Usanov S., Archakov A., Highly sensitive protein detection by combination of atomic force microscopy fishing with charge generation and mass spectrometry analysis. *FEBS J.* 2014; 281: 4705-17.
- 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; Article in press. (in Russian)
- Ivanov Y.D., Bukharina N.S., Pleshakova T.O., Frantsuzov P.A., Krokhin N.V., Ziborov V.S., Archakov A.I. Atomic force microscopy visualization and measurement of the activity and physicochemical properties of single monomeric and oligomeric enzymes. *Biofizika.* 2011; 56: 939-44. (in Russian)
- 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 CYP102 A1 solution during the enzyme reaction. *Biochemistry and Biophysics Reports.* 2016; 5: 285-9.
- Ivanov Y.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. *Biochemistry and Biophysics Reports.* 2016; 7: 20-5.
- Louis K.S., Siegel A.C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol.* 2011; 740: 7-12.

© Коллектив авторов, 2016

УДК 543,061: 543,068.7: 543,068.5: 577.1

Иванов А.В.¹, Кучукова М.Ю.², Вирюс Э.Д.¹, Зурина И.М.¹, Лузянин Б.П.¹, Кубатиев А.А.¹

Исследование гомоцистеинилирования белков плазмы крови методом капиллярного электрофореза

¹ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, 125315, ул. Балтийская, 8, тел. 8-499-151-1756, факс 8-495-601-2366

² — Государственное бюджетное учреждение здравоохранения г.Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина» Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, 125284, 2-й Боткинский пр-д, 5, тел. 8-495- 945-0045

Цель исследования — апробация и валидация подхода к определению отношения концентраций связанных с белками фракций цистеина и гомоцистеина в плазме крови человека методом капиллярного электрофореза с УФ-детектором. **Методика.** Белки плазмы крови восстанавливали дитиотреитолом и дериватизировали тиокарбонилдиимидазолом, после чего аналиты очищали от белков ультрафильтрацией. Введение аналитов в капилляр осуществляли электрокинетически. Разделение проводили в кварцевом капилляре длиной 48,5 см и внутренним диаметром 50 мкм, используя 0,2 М ацетат аммония с 25 мкМ гексадецилтриметиламмония бромидом. **Результаты.** Предел количественного определения по гомоцистеину составил 0,8 мкМ, воспроизводимость соотношения цистеин/гомоцистеин <5%, время анализа 15 мин. **Заключение.** Показано, что отношение связанных форм цистеина к гомоцистеину характеризуется теми же закономерностями, что и отношение их общего содержания. Оно имеет довольно высокую степень корреляции с уровнем связанного гомоцистеина и характеризуется меньшей вариабельностью, чем уровень общего гомоцистеина, что дает преимущество его использования для оценки риска развития осложнений сердечно-сосудистых заболеваний.

Ключевые слова: гомоцистеин, цистеин, капиллярный электрофорез, гомоцистеинилирование белков, тиокарбонилдиимидазол.

Для корреспонденции: Иванов Александр Владимирович, канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории Регуляции агрегатного состояния крови ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», e-mail: Ivanov_av82@mail.ru

Для цитирования: Иванов А.В., Кучукова М. Ю., Вирюс Э.Д., Зурина И.М., Лузянин Б.П., Кубатиев А.А. Исследование гомоцистеинилирования белков плазмы крови методом капиллярного электрофореза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 178—184.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 16-15-10340).

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.09.2016

Ivanov A.V.¹, Kuchukova M.Yu.², Virus E.D.¹, Zurina I.M.¹, Luzyanin B.P.¹, Kubatiev A.A.¹

Application of the capillary electrophoresis method for the study of plasma proteins homocysteinylation

¹ — Federal State Budget Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», Russia, Moscow, 125315, Baltiyskaya str., 8, phone +7-499-151-1756, fax +7-495-601-2366

² — State Budget Institution of Health in Moscow «Hospital named after S.P. Botkin» Moscow Health Department, Russia, Moscow, 125284, 2nd Botkinskiy Pr., 5, tel. +7-495- 945-0045

Purpose. This article describes the use of capillary electrophoresis with UV detection to determine the ratio of protein-bound homocysteine and cysteine concentrations in human plasma. **Methods.** Plasma samples were reduced with dithiothreitol and derivatized by thiocarbonyldiimidazole before being filtered again for purification of proteins. The pre-concentration of analytes was carried out directly in the capillary (48.5 cm in length and an inner diameter of 50 mkm) by NaOH post-injection. The eletrophoretic separation of analytes was carried out using 0.2 M ammonium acetate with 25 mM hexadecyltrimethylammonium bromide. **Results.** Limit of quantitation for homocysteine was 0.8 mkM, reproducible ratio of cysteine/homocysteine <5%, full analysis time 15 min. **Conclusion.** The ratio of bound cysteine to homocysteine is characterized by the same regularity as the ratio of their total content. It has a fairly high degree of correlation with the level of bound homocysteine and it is characterized by less variability than the level of total homocysteine. This has the advantage of use the bound cysteine/homocysteine ratio for assessing the risk of cardiovascular disease complications.

Keywords: bound homocysteine, bound cysteine, thiocarbonyldiimidazole, capillary electrophoresis, plasma.

For citation: Ivanov A.V., Kuchukova M.Yu., Virus E.D., Zurina I.M., Luzyanin B.P., Kubatiev A.A. Application of the capillary electrophoresis method for the study of plasma proteins homocysteinylation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (4): 178–184. (in Russ.)

For correspondence: Ivanov Alexander, FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», e-mail: Ivanov_av82@mail.ru

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Funding. This study was supported by grant from the Russian Science Foundation (project Nu. 16-15-10340).

Received 16.09.2016

Введение

Около половины цистеина (Цис) и большая часть (70—80%) гомоцистеина (Гцис) плазмы крови ковалентно связаны с цистеиновыми остатками белков, и поэтому эта их часть обозначаются как связанная форма (сЦис, сГцис) [1]. Повышенный уровень (>10—15 мкМ) общего содержания Гис (оГцис) плазмы, или гипергомоцистеинемия, является независимым фактором риска развития многих сосудистых заболеваний [2]. Интерес к определению сГцис обусловлен тем, что гомоцистеинилирование белков приводит к их окислительному повреждению и утрате функции [3], а также накоплению Гцис в клетках, которые активно утилизируют белки плазмы [4, 5]. Цис является конечным продуктом метаболизма Гцис по пути транссульфурации и основным конкурентом за сайты связывания с белками. Тесная связь их метаболизма вызывает интерес к использованию соотношения сЦис/сГцис как альтернативу определению оГцис в плазме крови. Было показано, что оно лучше отражает нарушения пути транссульфурации и биодоступность Гцис, а также может учитывать преаналитические ошибки [6]. Также была выявлена положительная связь оГцис и отрицательная связь оЦис с риском развития колоректального рака у женщин в постменопаузе [7].

Распространенным методом для анализа оГцис является ИФА [8], однако он не может использоваться для одновременного определения других тиолов. Было предложено множество аналитических методов с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и капиллярного электрофореза (КЭ) с ультрафиолетовым (УФ) [9—11], флуоресцентным [1, 12, 13], а также электрохимическим [14] детекторами или масс-спектрометрией [15, 16]. Чувствительность большинства из них (<0,1 мкМ) достаточна не только для определения общего содержания, но и свободной или даже восстановленной фракций аминокислот. Несмотря на достоинства КЭ-УФ (доступность, селективность, производительность, экономичность и др.), его использование для такого анализа является нетривиальной задачей. Было предпринято несколько попыток адапти-

ровать КЭ-УФ для анализа общего Гцис, используя дериватизацию распространенными для ВЭЖХ реагентами [17—19], но достигнутая в лучшем случае чувствительность (5 мкМ) не позволит проводить достоверный анализ сГцис, так как его типичное содержание составляет ~5—9 мкМ. Лучшие результаты были показаны в работе [13] где использовали прямой анализ аминокислот в коротковолновой области (190 нм). В этом случае предел количественного определения в модельных растворах составлял 1 мкМ. Однако применение этого подхода к образцам биологических жидкостей связано с серьезными затруднениями из-за присутствия большого количества мешающих компонентов. На сегодняшний день нам известно только два успешных метода анализа плазменных тиолов методом КЭ-УФ. В частности, применяется дериватизация тетрафтороборатом 2-хлор-1-метилхинолина с последующим рН-зависимым концентрированием аналитов [20]. В обоих случаях предел обнаружения составлял 1 мкМ. Существенным ограничением этого подхода является то, что дериватирующий реагент не является стабильным и коммерчески доступным и требует самостоятельного синтеза. Очень высокая чувствительность (0,065—0,01 мкМ) была показана прямым анализом аминокислот с использованием Au-наночастиц, позволяющих их селективно сконцентрировать и очистить [21]. Однако этот подход также связан с необходимостью самостоятельного синтеза наночастиц, а также длительным анализом (около 40 мин). Поэтому имеется потребность в разработке более простых и доступных методов КЭ-УФ.

При выборе подходящего дериватирующего агента для КЭ-УФ мы придерживались следующих требований. Во-первых, он не должен осложнять концентрирование аналитов в капилляре, которое неизбежно ввиду ограниченной загрузки капилляра. Во-вторых, его избыток не должен интерферировать с пиками аналитов. Это означает, что желательно использовать незаряженный реагент, но продукты дериватизации должны нести заряд одного знака, притом в широких диапазонах рН. Широко распространенные соединения для анализа тиолов, такие, как 5,5-дитио-

бис-(2-нитробензойная кислота) (ДТНБ), монобромобиман, 4-аминосульфони́л-7-фтор-2,1,3-бензоксадиазолин или 2,2'-дипиридилдисульфид не удовлетворяют этим условиям. В отличие от вышеперечисленных гомофункциональных агентов, 1,1'-тиокарбонилдимидазол (ТКДИ) связывает NH_2 - и SH -группы анализов, образуя гетероциклические производные с Цис, Гцис и др. аминотиолами [22]. Их кислотный характер дает возможность использовать различные методы КЭ-концентрирования, например, рН-зависимый щелочной стекнинг [23]. При этом сам агент и продукты его гидролиза являются слабыми электролитами, что соответствует вышеупомянутым требованиям. Первоначально ТКДИ использовался для ВЭЖХ-УФ анализа общих аминотиолов плазмы и мочи с использованием ТКДИ и ТФЭ соответствующих производных [22]. Ранее нами была изучена применимость данного реагента к определению связанных аминотиолов [24]. В данной работе мы применили и валидировали этот подход для сравнения уровня связанного Гцис с отношением общего содержания и связанных форм Цис/Гцис в плазме крови с использованием ТКДИ и КЭ-УФ.

Методика

Реактивы. Муравьиная кислота для ВЭЖХ-МС (Fluka, Германия), ТКДИ purum (Sigma-Aldrich, Швейцария), ацетат аммония осч (Реахим, РФ), ацетонитрил для ВЭЖХ (Химмед, РФ), NaCl чда (Fluka, Швейцария), пеницилламин (ПА) (Sigma-Aldrich, Германия), дитиотреитол (ДТТ) >99,5% (Fluka, Германия), Цис 97% (Aldrich, США), цистеинилглицин >85% (Sigma, Германия), Гцис >95% (Sigma, Германия), гексадецилтриметиламмония бромид (СТАВ) (Sigma, Индия), NaOH чда (Диа-М, пр-во Германия), ДТНБ (Sigma-Aldrich, США), этилендиаминотетрауксунная кислота (ЭДТА-Na) дигидрат >99% (AppliChem, Германия). Для получения деионизованной воды использовали установку Millipore Simplicity 185 с картриджом Simpakor 1.

Ультрафильтрацию проводили на фильтрах Amicon Ultra-3K (Millipore, Ирландия) 10—15 мин при 14000g.

Концентрированные растворы анализов (Цис — 100 мМ, Гцис — 50 мМ, ПА — 50 мМ и цистеинилглицин — 25 мМ) были приготовлены путем растворения навески вещества в соответствующем объеме 0,1% (об./об.) HCOOH и хранились при 80°C. Для восстановления использовали свежий раствор 0,1 М ДТТ. ТКДИ растворяли в одном объеме ацетонитрила и добавляли 9 объемов воды.

Оборудование и ПО:

1. Система КЭ Agilent CE 3D system (Германия) с УФ-диодноматричным детектором. Поглощение измеряли при 254 (ширина 20 нм) с частотой 5 Гц. Использовали кварцевый капилляр внутренним диаметром 50 мкм и общей длиной 48,5 см (40 см до детектора).

2. Система ВЭЖХ Waters Acquity UPLC с диодно-матричным детектором PDA λ . Поглощение измеряли при 330 (ширина 5 нм) с частотой 10 Гц. Использовали колонку Agilent Poroshell-120 SB-C18 150x2,1 мм x 2,7 мкм.

Для регистрации сигнала и интегрирования площадей пиков использовали ПО ChemStation 32 (Agilent) и MassLynx 4.1 (Waters), анализ данных в Microsoft Excel 2003.

Пробоподготовка. Для исследования использовалась венозная кровь доноров-женщин (N = 19, 35—47 лет, средний возраст 41 год) подписавших информированное согласие. Кровь была собрана в пробирки с цитратом Na (3,8%). Все добровольцы не имели в анамнезе сердечно-сосудистых заболеваний. Образцы крови центрифугировали немедленно после получения при 3000g 3 мин. Плазму отделяли и хранили при 20°C перед дальнейшими манипуляциями.

Связанные гомоцистеин и цистеин. К 450 мкл воды добавляли 50 мкл плазмы и фильтровали через Amicon Ultra 3K. Затем оставшийся на фильтре раствор (~100 мкл) смешивали с 400 мкл воды и снова фильтровали. После к остатку добавляли 50 мкл 100 мкМ ПА (внутренний стандарт) содержащий 20 мМ ДТТ и инкубировали 10 мин при 37°C. К раствору добавляли 100 мкл 50 мМ ТКДИ и центрифугировали при 5000g 5 мин. Супернатант фильтровали через Amicon Ultra 3K. Пробу хранили при 4°C до трех дней перед анализом.

Валидация. Калибровку анализов проводили в воде и плазме, прошедшей вышеописанную обработку. Для построения градуировочных зависимостей было приготовлено 7 водных растворов с концентрациями Цис — 0; 15,6; 31,3; 62,5; 125; 250 и 500 мкМ, Гцис — 0; 3,1; 6,3; 12,5; 25; 50 и 100 мкМ соответственно. Была также построена градуировочная зависимость с использованием плазмы крови, полученных из смеси восьми образцов от разных доноров, к которой перед восстановлением и дериватизацией были добавлены аналиты до концентраций 0; 62,5; 125; 250 и 500 мкМ Цис и 0; 12,5; 25; 50 и 100 Гцис. После 10 мин инкубации при 25°C пробы были обработаны согласно вышеописанной процедуре. Опреде-

ление предела количественного определения было выполнено с использованием образцов плазмы без восстановления, но с дериватизацией, только для связанного Цис, как наиболее сложного для анализа аналита. Правильность методики определяли путем добавления к образцам плазмы ($N = 5$) после ультрафильтрации добавляли аликвоты (1/5 объема плазмы) растворов аналитов до концентраций Гцис 2,0 и 10 мкМ; Цис 10 и 75 мкМ соответственно (в пересчете на исходный объем плазмы). Для линейного регрессионного анализа использовали отношения площадей пиков аналит/внутренний стандарт (ПА) помноженные на концентрацию стандарта в пересчете на объем плазмы крови.

КЭ. Перед анализом капилляр промывали 1 М NaOH, 10 мМ СТАВ, водой и фоновым электролитом (0,2 М ацетат аммония с 25 мкМ СТАВ) по 2 мин. Образец инжестировали при -15 кВ (режим «обращенного поля») 30 с, затем 60 с 0,2 М NaOH при том же напряжении. Разделение проводили при -15 кВ 15 мин. Промывка — 1 мин водой и 2 мин электролитом.

Общее содержание гомоцистеина и цистеина определяли путем предколоночной дериватизации тиолов 5,5-дитиобис-2-нитробензойной кислотой и хроматографического разделения соответствующих производных. К 200 мкл плазмы добавляли по 40 мкл 0,25 мМ ПА; 40 мкл 50 мМ ДТТ; 20 мкл воды и 80 мкл 200 мМ Na-фосфатного буфера с 10 мМ ЭДТА-Na, pH 7,4. Смесь инкубировали 10 мин при 37°C. Затем добавляли 400 мкл этанола и 400 мкл 50 мМ ДТНБ в EtOH, инкубировали 10 мин при 24°C, после 30 мин при 4°C и центрифугировали 10 мин. при 15000g. Супернатант (400 мкл) отбирали и упаривали досуха под вакуумом ~3 часа при 60°C. Высушенный образец растворяли в воде (0,5 мл) и центрифугировали 15 с при 10000g для осаждения нерастворимого остатка.

Объем инъекции составлял 2 мкл. Элюцию осуществляли при потоке 0,2 мл/мин градиентом ацетонитрила 2,5—10% за 5 мин, затем 70% 1,5 мин и 2,5% 4 мин. Коэлюент — 0,1 М ацетата аммония с 0,111% (об./об.) муравьиной кислоты.

Результаты и обсуждение

Так как дериватизация ТКДИ придает рассматриваемым аналитам анионный характер, то к ним можно применять методики концентрирования, основанные на электрокинетическом введении (ЭВ) в так называемом «обращенном поле» когда анодом служит выходной конец капилляра. Для того чтобы об-

ратить электроосмотический поток в сторону анода, предотвратив тем самым «утечку» аналитов, применяют динамическое покрытие катионными поверхностно-активными веществами типа СТАВ [22].

ЭВ позволяет существенно увеличить количество вводимых в капилляр аналитов по сравнению с гидродинамическим вводом если ионная сила пробы существенно меньше, чем у раствора, которым заполнен капилляр (электролита). В процессе ЭВ формируется зона, в которой происходит замещение анионов электролита на анионы пробы. Так как при длительной инъекции ширина этой зоны сильно ухудшает разделительную способность, то после пробы проводят ЭВ раствора щелочи, которая формирует градиент pH, что приводит к сужению пиков аналитов. Поэтому такой подход называют pH-зависимым щелочным стекингом [22]. Так как ионная сила плазмы является наиболее важным фактором, ограничивающим эффективность ЭВ, мы применили ультрафильтрацию для того, чтобы отделить большую часть солей от белков плазмы крови. Элетрофореграмма образца человеческой плазмы приведена на рис. 1. Добавка к образцу 1/10 объема 100 мМ NaCl приводила к снижению величины пиков аналитов в 10 раз (дан-

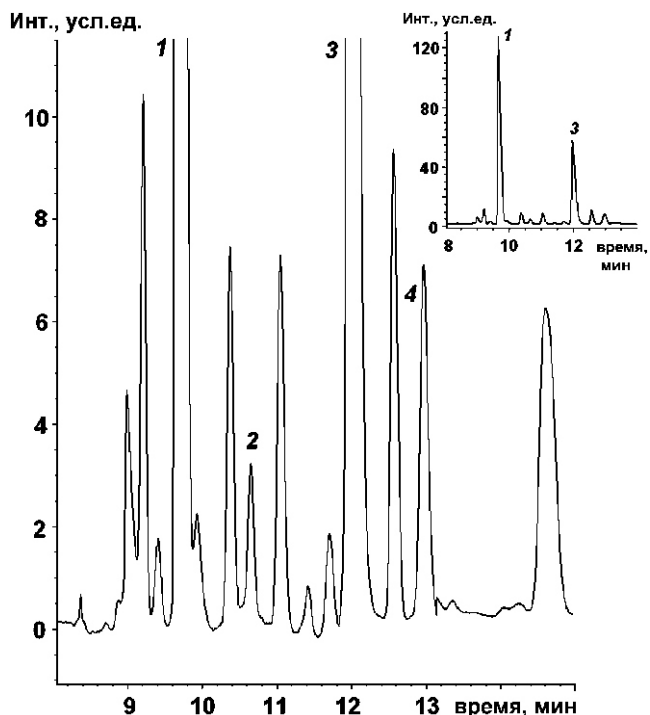


Рис. 1. Электрофореграмма образца плазмы крови (белок-связанные фракции аминотиолов). 1 — Цис, 2 — Гцис, 3 — ПА (внутренний стандарт), 4 — цистеинилглицин. Капилляр 48,5 см, 50 мкм внутр. диам., ЭВ -15 кВ 30 с затем -15 кВ 60 с 0,2 М NaOH, напряжение -15 кВ в 0,2 М ацетате аммония с 25 мкМ СТАВ

ные не приводятся). Как видно из рисунка, условия КЭ также позволяют определять дипептид цистеинилглицин, продукт гидролиза глутатиона. Относительные времена миграции Цис и Гцис составили $0,8 \pm 0,02$ и $0,882 \pm 0,014$ соответственно.

Градуировочные зависимости $s_{\text{Цис}}$ и $s_{\text{Гцис}}$ в плазме крови демонстрировали линейный характер во всем диапазоне добавленных концентраций и имели вид $y = 0,0135x + 1,4$, $y = 0,0086x + 0,029$ соответственно. В водном растворе были получены близкие значения $y = 0,0136x + 0,124$ (Цис) и $y = 0,0083x + 0,0095$ (Гцис). Во всех случаях коэффициент корреляции составлял $>0,99$ ($p < 0,0001$), из чего можно сделать вывод о том, что матричный эффект не влияет на определение данным методом. Воспроизводимость инъекции (CV) составляла для соотношений аналит/ПА и $s_{\text{Цис}}/s_{\text{Гцис}}$ менее 5%, а по площадям пиков $s_{\text{Цис}}$ и $s_{\text{Гцис}}$ 8 и 12%.

Для определения предела количественного определения $s_{\text{Гцис}}$ было использовано два образца плазмы. Один образец прошел полную пробоподготовку, вто-

рой был дериватизирован не подвергаясь восстановлению (т.е. содержал следовые количества Гцис). Первый образец был разбавлен вторым в 2, 4 и 8 раз. В последнем случае концентрация $s_{\text{Гцис}}$ составляла 0,8 мкМ и $S/N = 7$. Так как среднее содержание $s_{\text{Гцис}}$ составляет более 5 мкМ [1, 29, 30], то S/N для этого уровня составит более 40, что вполне достаточно для его достоверного определения и расчета $s_{\text{Цис}}/s_{\text{Гцис}}$.

Правильность для $s_{\text{Гцис}}$ при его добавлении к фильтрату плазмы на уровне 2,0 и 10 мкМ составляла 108 ± 17 и $94 \pm 14\%$ соответственно. Для $s_{\text{Цис}}$ — $107 \pm 26\%$ при добавке 10 мкМ и $96 \pm 10\%$ при добавке 75 мкМ соответственно.

Средние концентрации (и размах) $s_{\text{Цис}}$ и $s_{\text{Гцис}}$ в 19 образцах плазмы крови составили 132 ± 35 (70—182) и $5,7 \pm 2,7$ (1,9—13,3) мкМ соответственно. Общее содержание Цис и Гцис составляло 185 ± 32 (130—244) и $8,8 \pm 2,8$ (5,2—16,2) мкМ соответственно. Эти значения находятся в пределах, опубликованных ранее для здоровых людей [1, 25]. Среднее отношение $o_{\text{Цис}}/o_{\text{Гцис}}$ и $s_{\text{Цис}}/s_{\text{Гцис}}$ со-

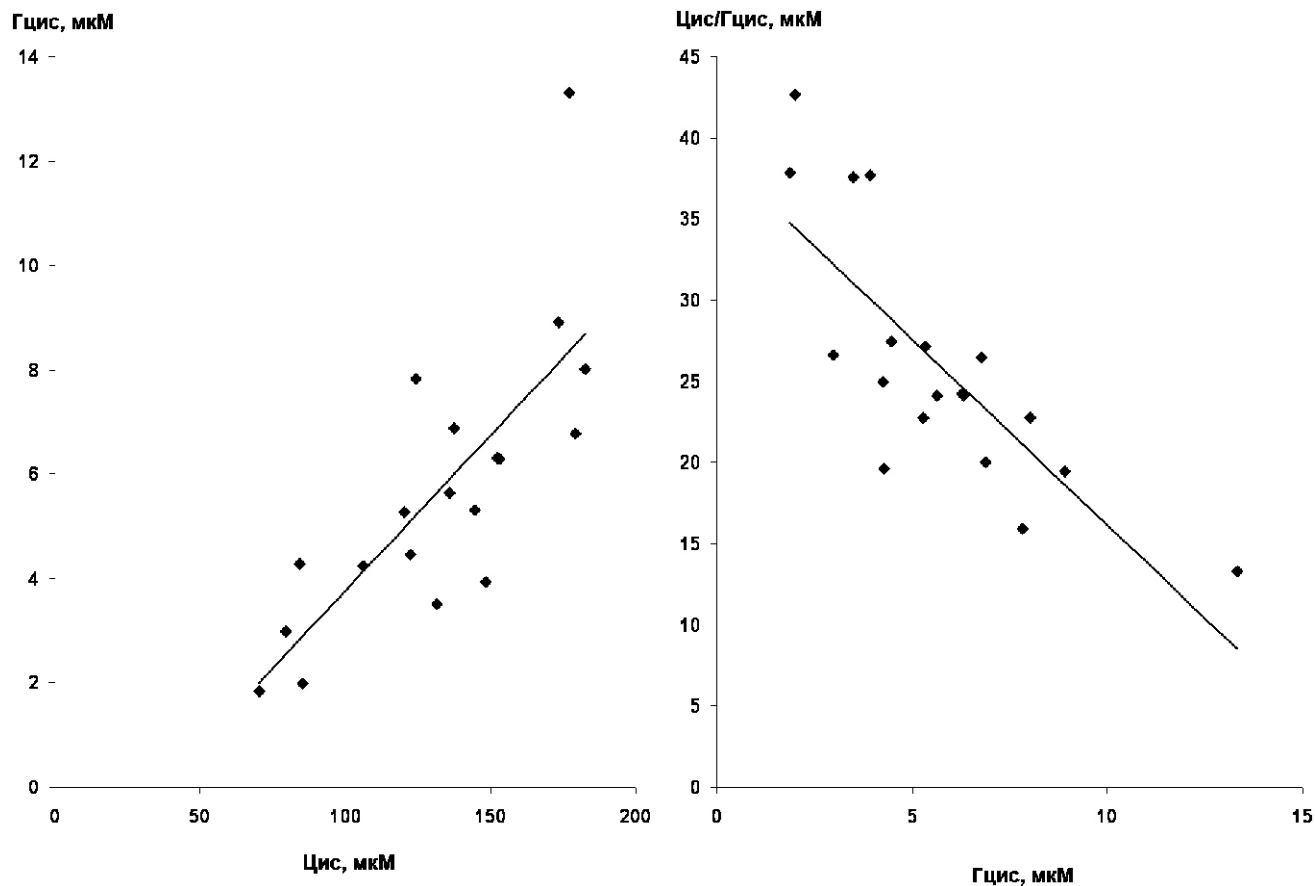


Рис. 2. Концентрационные зависимости белок-связанных аминокислот в образцах плазмы крови (N = 19). А — Цис и Гцис, Б — Гцис и Цис/Гцис.

ставляло $22,5 \pm 5,3$ (7,6—30,2) и 26 ± 8 (13—43) соответственно, что близко к значениям, ранее полученным для соотношения $o\text{Цис}/o\text{Гцис}$ [6]. Соотношение $c\text{Цис}/c\text{Гцис}$ отличается меньшим разбросом ($CV = 31\%$), чем $c\text{Гцис}$ ($CV = 47\%$), но большим, чем $o\text{Цис}/o\text{Гцис}$ ($CV = 24\%$). Между $c\text{Цис}$ и $c\text{Гцис}$ найдена существенная положительная корреляция (рис. 2А, $r = 0,77$, $p < 0,001$), а между $c\text{Гцис}$ и $c\text{Цис}/c\text{Гцис}$ — отрицательная (рис. 2Б, $r = -0,79$, $p < 0,001$). Аналогичные результаты были получены при сравнении $o\text{Цис}$ с $o\text{Гцис}$ ($r = 0,77$, $p < 0,001$) и $o\text{Гцис}$ с $o\text{Цис}/o\text{Гцис}$ ($r = -0,819$, $p < 0,001$), что согласуется с результатами, полученными ранее на выборке значительно большего объема [6]. Также выявлена ещё более тесная корреляция между $c\text{Гцис}$ и $c\text{Гцис}/c\text{Цис}$ ($r = 0,86$, $p < 0,001$, данные не приведены), но её не обнаружено между $c\text{Цис}$ и $c\text{Цис}/c\text{Гцис}$ ($r = -0,41$, данные не приведены). Аналогичные результаты были получены при сравнении общего содержания тиолов ($o\text{Гцис}$ vs. $o\text{Цис}/o\text{Гцис}$: $r = 0,83$, $p < 0,001$; $o\text{Цис}$ vs. $o\text{Цис}/o\text{Гцис}$: $r = -0,25$).

Таким образом, используя представленный подход КЭ-УФ можно проводить определение связанных форм Цис и Гцис. Показано что отношение $c\text{Цис}/c\text{Гцис}$ характеризуется теми же закономерностями, что и $o\text{Цис}/o\text{Гцис}$. Оно имеет довольно высокую степень корреляции с уровнем $c\text{Гцис}$ и характеризуется меньшей вариабельностью, что дает дополнительные основания использовать его в качестве альтернативы определению $o\text{Гцис}$ для оценки риска развития осложнений сердечно-сосудистых заболеваний.

Поскольку связанные тиолы находятся в окисленной форме, то необходимо перед дериватизацией использовать восстановитель. В этой роли больше всего подходят реагенты тиольного ряда, так как производные фосфинов или NaBH_4 сильно снижают эффективность ЭВ. Показано, что закономерности, характерные для их общего содержания также справедливы и для связанных форм этих анализов. Чтобы выделить белки плазмы мы применили ультрафильтрацию, но возможно также использование геле-фильтрации. Благодаря рН-зависимому концентрированию анализов и разделительной способности КЭ число теоретических тарелок при использовании данного подхода составило 65 000. Также следует отметить, что, в отличие от ранее предложенного метода ВЭЖХ-УФ [23], здесь не требуется использовать ТФЭ, так как селективная очистка происходит на этапе ультрафильтрации и ЭИ. При этом чувствительность методов оказалось сопоставимой, что бывает редко при сравнении ВЭЖХ и КЭ.

References

1. Williams R.H., Maggiore J.A., Reynolds R.D., Helgason C.M. Novel approach for the determination of the redox status of homocysteine and other amino thiols in plasma from healthy subjects and patients with ischemic stroke. *Clin. Chem.* 2001; 47(6): 1031-1039.
2. Newton L.A., Sandhu K., Livingstone C., Leslie R., Davis J. Clinical diagnostics for homocysteine: a rogue amino acid? *Exp. Rev. Mol. Diagn.* 2010; 10(4): 489-500.
3. McCully K.S. Chemical pathology of homocysteine. IV. Excitotoxicity, oxidative stress, endothelial dysfunction, and inflammation. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2009; 39(3): 219-232.
4. Sengupta S., Wehbe C., Majors A.K., Ketterer M.E., DiBello P.M., Jacobsen D.W. Relative roles of albumin and ceruloplasmin in the formation of homocystine, homocysteine-cysteine-mixed disulfide, and cystine in circulation. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(50): 46896-46904.
5. Zhloba A.A., Subbotina T.F. Homocysteinylation score of high-molecular weight plasma proteins. *Amino Acids.* 2014; 46(4): 893-899.
6. Hortin G.L., Sullivan P., Csako G. Relationships among plasma homocysteine, cysteine, and albumin concentrations: potential utility of assessing the cysteine/homocysteine ratio. *Clin. Chem.* 2001; 47(12): 1121-1124.
7. Miller J.W., Beresford S.A., Neuhaus M.L., Cheng T.Y., Song X., Brown E.C., Zheng Y., Rodriguez B., Green R. and Ulrich C.M. Homocysteine, cysteine, and risk of incident colorectal cancer in the Women's Health Initiative observational cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* 2013; 97(4): 827-834.
8. Pernet P., Lasnier E. and Vaubourdolle M. Evaluation of the AxSYM homocysteine assay and comparison with the IMx homocysteine assay. *Clin. Chem.* 2000; 46(9): 1440-1441.
9. Andersson A., Isaksson A., Brattstrom L., Hultberg B. Homocysteine and other thiols determined in plasma by HPLC and thiol-specific postcolumn derivatization. *Clin. Chem.* 1993; 39(8): 1590-1597.
10. Katrusiak A.E., Paterson P.G., Kamencic H., Shoker A., Lyon A.W. Pre-column derivatization high-performance liquid chromatographic method for determination of cysteine, cysteinyl-glycine, homocysteine and glutathione in plasma and cell extracts. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 2001; 758(2): 207-212.
11. Kusmierk K. and Bald E. Reversed-phase liquid chromatography method for the determination of total plasma thiols after derivatization with 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide. *Biomed. Chromatogr.* 2009; 23(7): 770-775.
12. Wada M., Kuroki M., Minami Y., Ikeda R., Sekitani Y., Takamura N., Kawakami S., Kuroda N. and Nakashima K. Quantitation of sulfur-containing amino acids, homocysteine, methionine and cysteine in dried blood spot from newborn baby by HPLC-fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.* 2014; 28(6): 810-814.
13. Zinellu A., Sotgia S., Scanu B., Pisanu E., Sanna M., Sati S., Deiana L., Sengupta S. and Carru C. Determination of homocysteine thiolactone, reduced homocysteine, homocystine, homocysteine-cysteine mixed disulfide, cysteine and cystine in a reaction mixture by overimposed pressure/voltage capillary electrophoresis. *Talanta.* 2010; 82(4): 1281-1285.
14. Baron M. and Sochor J. Estimation of thiol compounds cysteine and homocysteine in sources of protein by means of electrochemical techniques. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2013; 8: 11072-11086.

15. Jiang Z., Liang Q., Luo G., Hu P., Li P., Wang Y. HPLC-electrospray tandem mass spectrometry for simultaneous quantitation of eight plasma amino thiols: application to studies of diabetic nephropathy. *Talanta*. 2009; 77(4): 1279-1284.
16. Ivanov A.V., Luzyanin B.P. and Kubatiev A.A. S-Adenosylhomocysteine Assay in the Urine by Capillary Electrophoresis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012; 152(3): 289-292.
17. Russell J. and Rabenstein D.L. Speciation and quantitation of underivatized and Ellman's derivatized biological thiols and disulfides by capillary electrophoresis. *Anal. Biochem.* 1996; 242(1): 136-144.
18. Ivanov A.R., Nazimov I.V. and Baratova L. A. Determination of biologically active low-molecular-mass thiols in human blood. II. High-performance capillary electrophoresis with photometric detection. *J. Chromatogr. A*. 2000; 895(1-2): 167-171.
19. Sevcikova P., Glatz Z. and Tomandl J. Determination of homocysteine in human plasma by micellar electrokinetic chromatography and in-capillary detection reaction with 2,2'-dipyridyl disulfide. *J. Chromatogr. A*. 2003; 990(1-2): 197-204.
20. Kubalczyk P., Bald E., Furmaniak P. and Glowacki R. Simultaneous determination of total homocysteine and cysteine in human plasma by capillary zone electrophoresis with pH-mediated sample stacking. *Anal. Methods*. 2014; 6: 4138-4143.
21. Chang C.W. and Tseng W.L. Gold nanoparticle extraction followed by capillary electrophoresis to determine the total, free, and protein-bound amino thiols in plasma. *Anal. Chem.* 2010; 82(7): 2696-2702.
22. Amarnath K., Amarnath V., Amarnath K., Valentine H.L., Valentine W.M. A specific HPLC-UV method for the determination of cysteine and related amino thiols in biological samples. *Talanta*. 2003; 60(6): 229-238.
23. Hoque M.E., Arnett S.D. and Lunte C.E. On-column preconcentration of glutathione and glutathione disulfide using pH-mediated base stacking for the analysis of microdialysis samples by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2005; 827(1): 51-57.
24. Ivanov A.V., Luzyanin B.P., Virus E.D., Kubatiev A.A. *Pathogenes*. 2013; 11(4): 49-53. (in Russian)
25. Hortin G.L., Seam N., Hoehn G.T. Bound homocysteine, cysteine, and cysteinylglycine distribution between albumin and globulins. *Clin. Chem.* 2006; 52(12): 2258-2264.

Сведения об авторах:

Иванов Александр Владимирович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории Регуляции агрегатного состояния крови ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Кучукова Мадина Юсуповна, кандидат медицинских наук, врач-терапевт отделения акушерства и гинекологии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Городской клинической больницы им. С.П. Боткина»

Вирюс Эдуард Даниелевич, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории Функциональной ангиопротеомики и метабономики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Зурина Ирина Михайловна, научный сотрудник лаборатории Клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Лузянин Борис Петрович, профессор, доктор химических наук, заведующий лабораторией Функциональной ангиопротеомики и метабономики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Кубатиев Аслан Амирханович, академик, профессор, доктор медицинских наук, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»