

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.pfiet.ru
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
5-летний ИФ РИНЦ 2015 0,690

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

Входит в Перечень ведущих рецензируе-
мых научных журналов и изданий,
рекомендованных ВАК России для пуб-
ликации значимых результатов диссертаци-
онных исследований на соискание ученой степени докто-
ра и кандидата наук.

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

Сдано в набор 27.11.2017 г.
Подписано в печать 14.12.2017 г.

ISSN 0031-2991

Пат. физиол. и Экспер. тер.
2017. Том 61. № 4. 1–158

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, 2017.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

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

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

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

Том 61, № 4, 2017
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. Гуштин (зам. главного редактора),
Г. Дауни (США), А.В. Ефремов, В.Б. Кошелев,
Н.А. Крупина, А.А. Кубатиев, П.Ф. Литвицкий,
Р. Маллет (США), О. Мацуо (Япония),
В.В. Новицкий, Г.В. Порядин,
В.К. Решетняк (зам. главного редактора),
Р. Сьюелл (Великобритания)

Редакционный совет

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

Home page: www.pfiet.ru
e-mail: path.physiol@yandex.ru

Publisher: Irishkin Dmitry
e-mail: genius-media@mail.ru

ISSN 0031-2991

Pathological
physiology
and experimental
therapy
2017; 61(4): 1–158.

THE INSTITUTE OF GENERAL PATHOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY

PATOLOGICHESKAYA FIZIOLOGIYA I EKSPERIMENTAL'NAYA TERAPIYA

Pathological physiology and experimental therapy

*Quarterly reviewed science and practical journal
Published since 1957*

Vol. 61, № 4, 2017

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, H. Downey (USA),
S.V. Grachev, T.A. Guskova, A.V. Efremov,
V.B. Koshelev, N.A. Krupina, A.A. Kubatiev,
P.F. Litvitskiy, R. Mallet (USA), O. Matsuo (Japan),
V.V. Novitskiy, G.V. Poryadin, R. Sewell (UK)

Staff

Yu.V. Balyakin (Moscow), Yu.Yu. Byalovskiy (Ryazan),
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 (Moscow),
N.N. Petrishchev (Sankt-Peterburg),
L.A. Severyanova (Kursk), V. Shvarz (Germany),
A.P. Yastrebov (Ekaterinburg)

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А.** Экспериментальное тревожно-депрессивное состояние у крыс, вызванное неонатальным действием ингибитора дипептилдипептидазы-IV дипротина А: эффекты имипрамина 4
- Грудень М.А., Давыдова Т.В., Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Ветрилэ Л.А., Морозова-Роче Л., Sewell R.** Нейропротекторные эффекты антител к глутамату при нарушениях памяти, индуцированных олигомерами провоспалительного белка S100A9, у стареющих животных 13
- Дробленков А.В., Прошина Л.Г., Юхлина Ю.Н., Байрамов А.А., Никитина И.Л., Шабанов П.Д.** Тестостерон-зависимые изменения нейронов аркуатного ядра гипоталамуса и их обратимость при моделировании мужского гипогонадизма 21
- Огородова Л.М., Рукин К.Ю., Петрова И.В., Винтизенко С.И.** Диагностически значимые факторы-предикторы рестенозирования в стенке у пациентов с ИБС 31
- Восканян С.Э., Шабалин М.В., Колышев И.Ю., Найденов Е.В.** Оценка проходимости синтетических кондуитов из пористого политетрафторэтилена при реконструкции магистральных вен (экспериментальное исследование) 38
- Будник И.А., Морозова О.Л., Цымбал А.А., Шенкман Б., Эйнав Ю.** Влияние концентратов фибриногена, фактора XIII и активируемого тромбином ингибитора фибринолиза на плотность и фибринолитическую устойчивость кровяного сгустка в модели гиперфибринолиза 44
- Лыков А.П., Чернявский А.М., Повешченко О.В., Фомичев А.В., Суровцева М.А., Бондаренко Н.А., Ким И.И., Карева Ю.Е., Таркова А.Р.** Характеристика костномозгового клеточного трансплантата больных хронической сердечной недостаточностью до и после кратковременной экспозиции с эритропоэтином 51
- Дешевова Ю.Б., Мороз Б.Б., Насонова Т.А., Лебедев В.Г., Добрынина О.А., Лыршикова А.В.** Влияние культивированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани на восстановление кожи при местных лучевых поражениях 62
- Калиш С.В., Лямина С.В., Раецкая А.А., Малышев И.Ю.** Программирование противоопухолевого иммунного ответа *in vitro* и его использование для остановки пролиферации опухолевых клеток и увеличения продолжительности жизни мышей с карциномой *in vivo* 67
- Новицкий В.В., Янкович К.И., Колобовникова Ю.В., Дмитриева А.И., Уразова О.И., Пурлик И.Л., Кудяков Л.А., Чумакова С.П.** Механизмы формирования опухолеассоциированной тканевой эозинофилии при раке желудка и толстой кишки 74
- Березовская Г.А., Клокова Е.С., Петрищев Н.Н.** Генетические предикторы возобновления клиники ишемической болезни сердца после чрескожного коронарного вмешательства 81
- Тодосенко Н.М., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Малинина И.П., Литвинова Л.С.** Влияние дексаметазона на процессы активации и созревания CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ T-клеток при ревматоидном артрите *in vitro* 87
- Кашутин С.Л., Шерстеникова А.К., Николаев В.И., Ключарева С.Н., Пирятинская В.А.** Изучение содержания нейтрофилов, несущих молекулы адгезии, у больных псориазом 98
- Труш В.В., Соболев В.И.** Модулирующее влияние адреналина на развитие стероидной миопатии у белых крыс, индуцированной длительным введением гидрокортизона 104

ОБЗОРЫ

- Московцев А.А., Колесов Д.В., Мылникова А.Н., Зайченко Д.М., Соколовская А.А., Кубатиев А.А.** Ответы эндотелиальных клеток на деформацию сдвига: механотрансдукция, клеточный стресс и адаптация 112
- Гомазков О.А.** Нейрогенез в зрелом мозге человека. Обоснование терапевтического подхода 126
- Кузник Б.И.** GlycA — новый биомаркер воспалительных, онкологических, сердечно-сосудистых заболеваний, и предиктор смерти, независимо от причин, её вызывающих 136
- Стамбольский Д.В., Плеханова О.С., Юдина И.Ю., Калинина Н.И., Карагяур М.Н., Дубров В.Э., Кочиш А.Ю., Семина Е.В., Акопян Ж.А., Голубев И.О., Антонов А.В., Сафин Ш.М., Ткачук В.А.** Система мозгового нейротрофического фактора (BDNF) как мишень для создания лекарственных средств, восстанавливающих иннервацию 142

ХРОНИКА

- Крупина Н.А., Давыдова Т.В.** К 95-летию академика АМН СССР и РАМН Г.Н. Крыжановского 153
- Фомочкина И.И., Ломакин Н.В., Зыков К.А., Бурячковская Л.И., Кубышкин А.В.** Новое в молекулярных механизмах воспаления (Информация о XIII Всемирном Конгрессе по воспалению) 156

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Khlebnikova N.N., Krupina N.A.** Experimental anxiety-depressive state in rats caused by neonatal exposure to the inhibitor of dipeptidyl peptidase IV, diprotin A: effects of imipramine
- Gruden M.A., Davydova T.V., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Vetriele L.A., Morozova-Roche L., Sewell R.** Neuroprotective effects of glutamate antibodies on memory impairment induced by proinflammatory S100A9 protein oligomers in aging animals
- Droblenkov A.V., Proshina L.G., Yuhlina Yu.N., Bairamov A.A., Shabanov P.D., Nikitina I.L.** Testosterone-dependent changes in neurons of hypothalamic arcuate nucleus and reversibility of these changes by modeled male hypogonadism
- Ogorodova L.M., Rukin K.Yu., Petrova I.V., Vintizenko S.I.** Diagnostically important predictive factors for in-stent restenosis in patients with ischemic heart disease
- Voskanyan S.E., Shabalin M.V., Kolyshchev I.Ju., Naydenov E.V.** Evaluating the patency of PTFE grafts in reconstruction of great veins (experimental study)
- Budnik I.A., Morozova O.L., Tsymlal A.A., Shenkman B., Einav Y.** Effects of fibrinogen concentrate, factor XIII, and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor on clot firmness and fibrinolytic resistance in the model of hyperfibrinolysis
- Lykov A.P., Cherniavsky A.M., Poveshchenko O.V., Fomichev A.V., Survtseva M.A., Bondarenko N.A., Kim I.I., Kareva Yu.E., Tarkova A.R.** Characterization of bone marrow cells graft from patients with chronic heart failure before and after short-term exposure with erythropoietin
- Deshevoeva Yu.B., Moroz B.B., Nasonova T.A., Lebedev V.G., Dobryнина O.A., Lirshshikova A.V.** Effect of cultivated multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue to restore skin with local radiation lesions
- Kalish S.V., Lyamina S.V., Raetskaya A.A., Budanova O., P. Malyshev I.Yu.** Programming the anti-tumor immune response *in vitro* and its application to stop the growth of tumor cells and prolonging the lifespan of mice with carcinoma *in vivo*
- Novitsky V.V., Yankovich K.I., Kolobovnikova Yu.V., Dmitrieva A.I., Urazova O.I., Purlik I.L., Kudyakov L.A., Chumakova S.P.** The formation mechanisms of tumor-associated tissue eosinophilia in gastric cancer and colon cancer
- Berezovskaya G.A., Klokoval E.S., Petrishchev N.N.** Genetic predictors in recurrence of coronary artery disease symptoms after percutaneous coronary intervention
- Todosenko N.M., Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Malinina I.P., Litvinova L.S.** the *in vitro* effect of dexamethasone on maturation and differentiation of CD4⁺CD45RO⁺ T-cells in rheumatoid arthritis
- Kashutin S.L., Sherstennikova A.K., Nikolaev V.I., Klyuchareva S.N., Piryatinsky V.A.** The study of content neutrophils, carrier adhesion molecules, in patients with psoriasis
- Trush V.V., Sobolev V.I.** The modulating influence of adrenaline on the development of the steroid myopathy induced by long application of hydrocortisone at white rats

REVIEWS

- Moskovtsev A.A., Kolesov D.V., Mylnikova A.N., Zaychenko D.M., Sokolovskaya A.A., Kubatiev A.A.** Endothelial shear stress responses: mechanotransduction, cell stress and adaptation
- Gomazkov O.A.** Neurogenesis in adult human brain. Substantiation of a therapeutic approach
- Kuznik B.I.** GlycA — a new biomarker of inflammation, cancer, cardiovascular disease and a predictor of death, regardless of its causes
- Stambolsky D.V., Plekhanova O.S., Yudina I.Yu., Kalinina N.I., Karagiour M.N., Dubrov V.E., Kochish A.Yu., Semina E.V., Akopyan Zh.A., Golubev I.O., Antonov A.V., Safin Sh.M., Tkachuk V.A.** The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) system as a therapeutic target for development of drugs restoring innervation

CHRONICLE

- Krupina N.A., Davydova T.V.** 95 year anniversary of academician Georgy Kryzhanovsky
- Fomochkina I.I., Lomakin N.V., Zykov K.A., Burachkovskaya L.I., Kubyshkin A.V.** Novel approach in molecular mechanisms of inflammation (information about XIII World Congress on Inflammation)

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092.9

Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А.

Экспериментальное тревожно-депрессивное состояние у крыс, вызванное неонатальным действием ингибитора дипептидилпептидазы-IV дипротина А: эффекты имипрамина

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

В наших предыдущих исследованиях было показано, что ингибитор пролинспецифической пептидазы дипептидилпептидазы-IV (ДП-IV, ЕС 3.4.14.5) трипептид дипротин А, введенный крысам в 5—18 постнатальные дни, приводит к развитию у крыс подросткового возраста и взрослых животных эмоционально-мотивационных расстройств. Такие расстройства можно рассматривать как модель смешанного тревожно-депрессивного состояния. Однако специальных исследований по валидности данной модели проведено не было. **Цель** настоящей работы состояла в проверке влияния трициклического антидепрессанта имипрамина (ИМИ) на депрессивноподобное поведение крыс и уровень кортикостерона в сыворотке крови животных на модели смешанного тревожно-депрессивного состояния. **Методика.** У крыс в возрасте одного и двух мес. определяли уровень тревожности в автоматизированном тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» и оценивали депрессивноподобное поведение в тесте принудительного плавания. ИМИ вводили взрослым животным в течение 10 дней (20 мг/кг/день, интрагастрально). Уровень кортикостерона в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. **Результаты.** Неонатальное действие дипротина А приводило к повышению тревожности у крыс в возрасте 1 мес. Депрессивноподобное поведение обнаружено у животных в возрасте одного и двух мес. ИМИ нормализовал поведение животных в тесте принудительного плавания и снижал уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс. Кроме того, ИМИ снижал вес крыс. **Заключение.** Результаты исследования свидетельствуют в пользу адекватности модели смешанного тревожно-депрессивного расстройства, возникающего у крыс вследствие действия ингибитора ДП-IV дипротина А на второй-третьей неделях постнатального развития, клиническому прообразу заболевания по критериям «внешней схожести», прогностической и конструктивной валидности.

Ключевые слова: экспериментальное тревожно-депрессивное состояние; крысы; ингибитор дипептидилпептидазы-IV дипротин А; тест принудительного плавания; имипрамин; кортикостерон.

Для цитирования: Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А. Экспериментальное тревожно-депрессивное состояние у крыс, вызванное неонатальным действием ингибитора дипептидилпептидазы-IV дипротина А: эффекты имипрамина. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 4—12.

DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8517

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

Финансирование. Исследование поддержано грантом Российского Фонда Фундаментальных исследований № 15-04-08784.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность студентке психологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова П.В. Мавренковой за помощь в проведении экспериментов, а также ведущему инженеру лаб. общей патологии нервной системы ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» В.М. Комкову за техническую поддержку исследования.

Поступила 15.08.2017

Khlebnikova N.N., Krupina N.A.

Experimental anxiety-depressive state in rats caused by neonatal exposure to the inhibitor of dipeptidyl peptidase IV, diprotin A: effects of imipramine

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia

Previously, we have shown that the inhibitor of proline-specific peptidase, dipeptidyl peptidase-IV (DP-IV, EC 3.4.14.5), tripeptide diproptin A administered on postnatal days 5-18 induced emotional and motivational disorders in adolescent and adult rats. These disorders can be considered a model of a mixed anxiety-depression-like disorder. However, validation studies of this model are not available. The **aim** of this work was to test the effect of the tricyclic antidepressant, imipramine (IMI), on depressive-like behavior in rats and the level of serum corticosterone using the model of mixed anxiety-depressive state. **Methods.** The level of anxiety was assessed by the automated Elevated Plus Maze test and the depressive-like behavior was evaluated by the forced swimming test in one- and two-month old rats. IMI was administered to adult animals for ten days (20 mg/kg a day, intragastrically). Serum corticosterone concentrations were measured using ELISA. **Results.** The neonatal exposure to diproptin A increased anxiety in one-month old rats. The depressive-like behavior was observed in animals aged one and two months. IMI normalized behavior of animals in the forced swimming test and reduced serum levels of corticosterone. Also, IMI reduced body weight of rats. **Conclusion.** The results of the study evidenced adequacy of the model of mixed anxiety-depressive state induced by the DP-IV inhibitor, diproptin A, on the second and third postnatal weeks to the clinical prototype of disease according to criteria of face validity, predictive and construct validity.

Keywords: experimental anxiety-depressive state; inhibitor of dipeptidyl peptidase-IV, diproptin A; rats; forced swimming test; imipramine; corticosterone.

For citation: Khlebnikova N.N., Krupina N.A. Experimental anxiety-depressive state in rats caused by neonatal exposure to the inhibitor of dipeptidyl peptidase IV, diproptin A: effects of imipramine. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61 (4): 4–12. (in Russ). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8517

For correspondence: Nadezhda N. Khlebnikova, PhD, Leading Researcher, «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»; 8 Baltiyskaya Str., Moscow 125315, Russian Federation, e-mail: nanikh@yandex.ru

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

Funding. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 15-04-08784).

Acknowledgments. We thank Mrs. Polina Mavrenkova, the student of the Faculty of Psychology, Lomonosov Moscow State University, who kindly assisted in providing the data necessary for the analysis, and Mr. V.M. Komkov, a lead engineer from the «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», Moscow, Russia, for technical support of the research.

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

Received 15.08.2017

Введение

В раннем постнатальном периоде, когда продолжается формирование ЦНС, нервная система обладает особой чувствительностью к действию внешних факторов, вызывающих нейропластические изменения и, тем самым, изменяющих фенотип особи [1]. Эти изменения могут носить дезадаптивный характер. Вмешательство в развитие ЦНС путем стрессирования [2] или действия биологически активных соединений разной природы [3] приводит к изменению физиологических показателей, в первую очередь, состояния гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси (ГГА-оси) [4], и нарушению поведенческих реакций, что часто проявляется усилением депрессивности и тревоги [2].

Повышение активности одной из пролинспецифических пептидаз дипептидилпептидазы-IV (ДП-IV, EC 3.4.14.5) обнаружено в крови пациентов с симптомами депрессии и тревожности [5, 6]. Крысы с дефицитом ДП-IV, обусловленным мутацией гена, кодирующего пептидазу, напротив, менее тревожны, чем контрольные животные и демонстрируют менее

выраженный ответ на стресс на фоне сниженного уровня АКТГ и кортикостерона в плазме крови [7].

В наших исследованиях показано, что неонатальное действие ингибиторов пролинспецифической пептидазы дипептидилпептидазы IV (ДП-IV) — метионил-2(S)-цианопирролидина, дипротина А и ситаглиптина — индуцирует развитие длительных эмоционально-мотивационных нарушений у крыс, проявляющихся повышением уровня тревожности, развитием депрессивноподобного поведения и ростом стресс-провоцируемой агрессивности у животных подросткового возраста и взрослых особей [8–10]. В структурах мозга крыс с экспериментальным тревожно-депрессивным состоянием обнаружено повышение активности ДП-IV [11] и экспрессии гена, кодирующего ДП-IV [12]. На модели смешанного тревожно-депрессивного состояния, индуцированного неонатальным действием метионил-2(S)-цианопирролидина, было показано, что развитие признаков депрессивности в поведении сопровождается повышением уровня кортикостерона в сыворотке крови, а трициклический антидепрессант имипрамин норма-

лизует поведение и уровень кортикостерона [13]. Эти данные подтверждали валидность данной модели для критерия прогностической значимости [14] и свидетельствовали о вовлеченности ГГА-оси в патогенез эмоционально-мотивационных нарушений, вызванным синтетическим ингибитором ДП-IV.

Цель настоящего исследования заключалась в проверке эффектов имипрамина на депрессивноподобное поведение и уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс на модели смешанного тревожно-депрессивного состояния, индуцированного действием ингибитора ДП-IV дипротина А в неонатальном периоде.

Методика

Работа выполнена на белых крысах-самцах популяции Вистар (питомник ФГБНУ «НИИОПП»). Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде. Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с Директивой ЕС о защите животных, используемых в научных целях, — EU Directive 2010/63/EU от 22.09.2010 г. и «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016, под контролем Этического комитета ФГБНУ «НИИОПП».

В каждом помете сразу после рождения оставляли по 5 крысят мужского пола. День рождения считали нулевым постнатальным днем (ПНД). Свежеприготовленный раствор ингибитора ДП-IV дипротина А (Д, H-Ilе-Pro-Ile-OH, MW 341.45, Sigma-Aldrich, USA) в физиологическом растворе (ФР) вводили крысам опытной группы ($n = 30$) в дозе 2 мг/кг, в объеме 0,1 мл на 10 г веса, внутривентриально, один раз в день, в течение двух недель (с 5-го по 18-й ПНД включительно). Контрольным животным ($n = 27$) по той же схеме вводили ФР. В возрасте около 1 мес. крысят отделяли от матери и формировали экспериментальные группы таким образом, чтобы в состав каждой группы входили детеныши из трех-четырех пометов. Поведение крыс оценивали в возрасте одного и двух мес.

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) применяли для оценки тревожности. Конструкция ПКЛ подробно описана ранее [10]. В течение 5 мин с помощью автоматизированной видеосистемы «VideoMot2» (TSE System, Германия) определяли число заходов в открытые и закрытые рукава лабиринта (соответственно, ОР и ЗР), предпочтение ОР (отношение числа заходов в ОР к общему числу заходов в рукава), общий пробег и скорость перемещения животного в лабиринте. Снижение пред-

почтения открытых пространств расценивается как показатель увеличения тревожности [15]. Кроме того, под визуальным контролем определяли число свешиваний из ОР — показатель, который используют как характеристику поведения, связанного с риском: увеличение числа свешиваний из ОР свидетельствует о сниженном уровне тревожности и наоборот [16].

Тест принудительного плавания применяли для оценки депрессивноподобного поведения. Тестирование крыс проводили в цилиндрическом пластмассовом баке (высота — 47 см, внутренний диаметр — 35 см), заполненном водой на высоту 35 см, температура воды составляла 25—26°C. Использовали модификацию классического теста Порсолта [17], заключающуюся в том, что животное тестируют однократно, а не дважды с интервалом в 24 ч, так как показано, что однократное тестирование достаточно для выявления уже существующего депрессивноподобного состояния у крыс или эффектов хронического действия антидепрессантов [18]. Фиксировали число и суммарную длительность периодов активного плавания (энергичные движения всеми лапами с активным перемещением и/или попыткой выбраться). Длительность пассивного плавания (включает периоды полной неподвижности и периоды, когда крыса совершает слабые гребки одной-двумя лапами, необходимые для поддержания тела на плаву, — «иммобильность» по Порсолту) рассчитывали по разнице между длительностью тестирования, которая составляла 10 мин, и длительностью активного плавания. Увеличение длительности пассивного плавания рассматривается как признак развития депрессивноподобного поведения («поведенческого отчаяния») [19].

Проверка эффектов имипрамина. По результатам тестирования двухмесячных крыс в ситуации принудительного плавания формировали две пары групп животных, каждая пара состояла из опытной и контрольной подгрупп. В опытных подгруппах длительность пассивного плавания (включая периоды полной неподвижности) была статистически значимо выше, чем у крыс контрольных подгрупп (рис. 1), что свидетельствовало о депрессивноподобном поведении у крыс опытных подгрупп. В течение 10 дней ежедневно животным одной группы вводили классический трициклический антидепрессант имипрамин (ИМИ, препарат «Мелипрамин» таблетированный, «EGIS», Венгрия) в дозе 20,0 мг/кг, интрагастрально: «ФР + ИМИ», $n = 8$; «Д + ИМИ», $n = 8$; животным второй группы вводили воду: «ФР + вода», $n = 8$; «Д + вода», $n = 8$. Использовали свежеприготовленный раствор ИМИ: таблетки размельчали в ступе и растворяли в требуемом объеме воды. Повторное тестирование плавательного поведения проводили через сутки после последнего введения препаратов.

Определение уровня кортикостерона. Через 30 мин после окончания плавательного теста крыс декапитировали, немедленно отбирали пробы крови, которые использовали для получения сыворотки. Образцы сыворотки хранили при -20°C до момента измерения содержания кортикостерона. Определение уровня кортикостерона проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием диагностического набора EIA-4164 (DRG ELISA, США).

Относительную массу стресс-компетентных органов рассчитывали как отношение массы тимуса, селезенки или надпочечников к массе тела крысы перед декапитацией, в процентах.

Статистическую обработку данных проводили по алгоритмам программы «STATISTICA For Windows 7.0». После предварительной проверки гипотезы о нормальном характере распределения данных по тестам Колмогорова—Смирнова и Лиллиефорса применяли параметрические методы анализа, если гипотезу не отклоняли, и непараметрические методы, если гипотезу отклоняли. Использовали параметрический двухфакторный дисперсионный анализ Two-Way ANOVA [факторы «Группа» (дипротин А/ФР) и «Препарат» (ИМИ/вода)] и однофакторный дисперсионный анализ One-Way ANOVA (фактор «Группа») с *post hoc* анализом по тесту Ньюмана—Кеулса,

непараметрический критерий Манна—Уитни для независимых переменных и парный непараметрический критерий Вилкоксона (для внутригрупповых сравнений). Принятый уровень значимости составлял 5%. Данные представлены в виде $M \pm S.E.M.$

Результаты и обсуждение

Оценка уровня тревожности. Результаты оценки основных показателей поведения в тесте ПКЛ приведены в табл. 1. У крыс опытной группы в возрасте 1 мес. пробег и скорость перемещения в ПКЛ были меньше, чем в контрольной группе. Животные опытной группы также имели меньшее число свешиваний из ОР (на уровне выраженной тенденции), длительность свешиваний была статистически значимо меньше, чем у крыс контрольной группы. Результаты свидетельствовали о наличии признаков повышения тревожности и снижении психомоторной активности у крыс подросткового возраста, подвергнутых действию Д в неонатальном периоде.

В возрасте 2 мес. животные опытной и контрольной групп не различались по поведению в ПКЛ. Как в опытной, так и в контрольной группе взросление крыс сопровождалось статистически значимым снижением величины приведенных в табл. 1 показателей поведения в ПКЛ (во всех случаях $p < 0,05$; критерий Вилкоксона).

Таблица 1

Показатели поведения в приподнятом крестообразном лабиринте у крыс, которым в раннем постнатальном периоде вводили ингибитор ДП-IV дипротин А, и у контрольных животных, которым вводили физиологический раствор (ФР)

Показатели	Группы	
	ФР	Дипротин А
Возраст — 1 мес.		
Число заходов в ОР	$3,5 \pm 0,5$	$3,1 \pm 0,4$
Число заходов в ЗР	$10,7 \pm 0,6$	$9,3 \pm 0,6$
Предпочтение ОР, %	$21,9 \pm 2,5$	$23,6 \pm 2,0$
Общий пробег, см	$2571,7 \pm 86,5$	$2276,8 \pm 83,0^*$
Скорость, см/с	$8,6 \pm 0,3$	$7,6 \pm 0,3^*$
Число свешиваний из ОР	$7,4 \pm 1,0$	$4,8 \pm 0,7^+$
Длительность свешиваний, с	$6,8 \pm 1,1$	$3,2 \pm 0,6^*$
Возраст — 2 мес.		
Число заходов в ОР	$1,0 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,1$
Число заходов в ЗР	$6,5 \pm 0,8$	$6,1 \pm 0,7$
Предпочтение ОР, %	$10,7 \pm 3,0$	$6,9 \pm 2,2$
Общий пробег, см	$1846,3 \pm 84,9$	$1704,7 \pm 89,1$
Скорость, см/с	$6,2 \pm 0,3$	$5,7 \pm 0,3$
Число свешиваний из ОР	$1,0 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,2$
Длительность свешиваний, с	$0,7 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,2$
Примечание. * $p < 0,05$; + $p = 0,083$ — по сравнению со значением показателя в контрольной группе (U-критерий Манна—Уитни).		

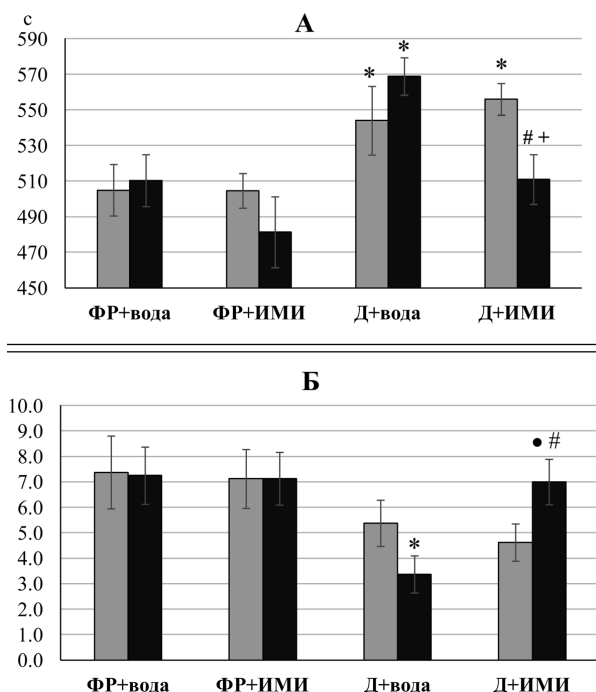


Рис. 1. Влияние имипрамина (ИМИ) на длительность пассивного плавания (А) и число периодов активного плавания (Б) у крыс с депрессивноподобным состоянием, вызванным неонатальным действием дипротина А (Д), в сравнении с крысами контрольной группы (введение ФР).

Серые столбики – фоновые значения показателей в возрасте 2 мес.; черные столбики – через 10 сут. ежедневного введения ИМИ (20 мг/кг) или воды; * $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей контрольной группой; • $p < 0,05$; + $p = 0,053$ по сравнению с группой «Д + вода» (post hoc анализ по тесту Ньюмана–Кеулса); # $p < 0,05$ по сравнению со значениями показателей в данной группе в тестирувании до введения ИМИ (по парному t -критерию Стьюдента).

Оценка депрессивноподобного поведения, эффекта имипрамина. У крыс опытной группы в возрасте 1 мес. вес не отличался статистически значимо от веса животных в контрольной группе (табл. 2). Однако длительность пассивного плавания была выше, чем в контроле: соответственно $472,0 \pm 13,1$ с и

$425,6 \pm 13,9$ с [$F(1,54) = 5,903$; $p = 0,018$, One-Way ANOVA]. Число периодов активного плавания в опытной группе было ниже, чем в контрольной: соответственно $5,9 \pm 0,5$ и $10,0 \pm 0,8$ [$F(1,54) = 20,279$; $p < 0,001$, One-Way ANOVA]. Результаты свидетельствовали о наличии признаков депрессивноподобного поведения у крыс подросткового возраста, которых в неонатальном периоде подвергали действию Д.

В возрасте двух мес. перед исследованием эффектом ИМИ животные групп «ФР + вода», «ФР + ИМИ», «Д + вода» и «Д + ИМИ» не различались по весу (табл. 2). В группах крыс, которым неонатально вводили Д, длительность пассивного плавания была выше, чем в контрольных подгруппах: $F(3,28) = 3,753$; $p = 0,022$, One-Way ANOVA, результаты post hoc анализа приведены на рис. 1, А. Просматриваемое снижение числа периодов активного плавания в опытных подгруппах не достигало уровня статистической значимости: $F(3,28) = 1,517$; $p = 0,232$, One-Way ANOVA. Таким образом, у взрослых животных опытных подгрупп сохранялись признаки повышения уровня депрессивности в поведении.

По окончании субхронического действия ИМИ/воды Two-Way ANOVA выявил влияние фактора «Группа» [$F = 8,481$; $p = 0,007$] и фактора «Препарат» [$F = 8,195$; $p = 0,008$] на длительность пассивного плавания крыс, взаимодействия факторов не обнаружено [$F = 0,916$; $p = 0,347$]. По результатам апостериорных сравнений сохранялось статистическое значимое превышение величины длительности пассивного плавания в группе «Д + вода» по сравнению с величиной показателя в группе «ФР + вода», то есть сохранялся депрессогенный эффект неонатального действия Д (рис. 1, А). Однако длительность пассивного плавания в группе «Д + ИМИ» не отличалась от величины показателя в группе «ФР + ИМИ», то есть ИМИ оказывал антидеп-

Таблица 2

Влияние имипрамина (ИМИ) в сравнении с водой на вес (г) крыс, которым в раннем постнатальном периоде вводили ингибитор ДП-IV дипротин А, и контрольных животных, которым вводили физиологический раствор (ФР)

Группы, возраст 1 мес.							
ФР				Дипротин А			
75,0 ± 1,8 (n = 27)				79,4 ± 1,5 (n = 30)			
Группы, возраст 2 мес.							
ФР + вода		ФР + ИМИ		Д + вода		Д + ИМИ	
До	После	До	После	До	После	До	После
200,8 ± 6,6 (n = 8)	249,0 ± 7,5 (n = 8)	180,5 ± 9,9 (n = 8)	211,8 ± 10,1* (n = 8)	192,0 ± 7,9 (n = 8)	245,3 ± 7,8 (n = 8)	198,8 ± 4,8 (n = 8)	222,8 ± 4,4* (n = 8)

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой крыс, которым вводили воду (post hoc анализ по тесту Ньюмана–Кеулса).

рессивное действие. Кроме того, длительность пассивного плавания в группе «Д + ИМИ» в тенденции была ниже, чем в группе «Д + вода». По результатам внутригрупповых сравнений в группе «Д + ИМИ» длительность пассивного плавания после введения ИМИ также снижалась.

После введения ИМИ/воды с помощью Two-Way ANOVA обнаружено влияние фактора «Группа» на число периодов активного плавания: $F = 4,387$; $p = 0,045$; в тенденции также выявлено влияние фактора «Препарат» ($F = 3,357$; $p = 0,078$) и взаимодействие факторов ($F = 3,856$; $p = 0,060$). По результатам *post hoc* анализа (рис. 1, Б) в группе «Д + вода» число периодов активного плавания было ниже, чем в группе «ФР + вода», то есть в отсутствие ИМИ депрессивноподобное поведение у крыс опытной подгруппы было выражено. В группе «Д + ИМИ», напротив, число периодов активного плавания было больше, чем в группе «Д + вода». Кроме того, величина показателя в группе «Д + ИМИ» повышалась после ИМИ по сравнению со значением, полученным в предыдущем тестировании.

По результатам внутригруппового анализа во всех группах вес крыс по окончании введения препаратов был выше, чем перед введением (во всех случаях $p < 0,001$, парный *t*-критерий Стьюдента). Двухфакторный анализ Two-Way ANOVA выявил влияние фактора «Препарат» на вес крыс: $F = 15,009$; $p < 0,001$. Вес животных в подгруппах с введением ИМИ был статистически значимо ниже, чем в соответствующих подгруппах животных, которым вводили воду (табл. 2).

Уровень кортикостерона и относительная масса стресс-компетентных органов. С помощью двухфакторного дисперсионного анализа Two-Way ANOVA обнаружено влияние фактора «Препарат» (выраженная тенденция) на уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс: $F = 3,801$; $p = 0,061$; не обнаружено статистически значимого влияния фактора «Группа», однако установлено статистически значимое взаимодействие факторов «Группа» и «Препарат»:

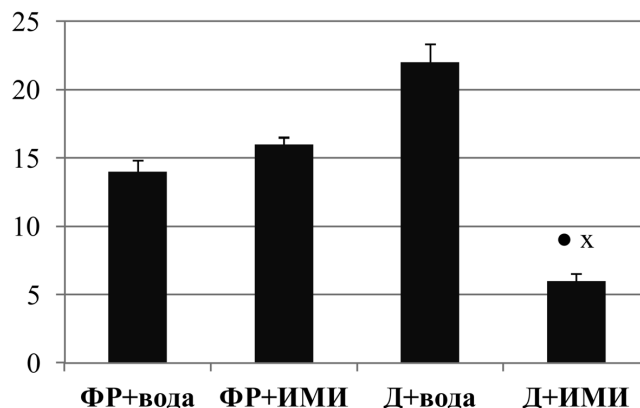


Рис. 2. Влияние имипрамина (ИМИ) на уровень кортикостерона (нг/мл) в сыворотке крови крыс с депрессивноподобным состоянием, вызванным неонатальным действием дипротина А (Д), и крыс контрольной группы (введение ФР). • $p < 0,05$ по сравнению с группой «Д + вода»; * $p = 0,090$ по сравнению с группой «ФР + ИМИ» (*post hoc* анализ по тесту Ньюмана—Кеулса).

рат»: $F = 5,385$; $p = 0,028$. У крыс подгруппы «Д + ИМИ» уровень кортикостерона в сыворотке крови был статистически значимо ниже, чем у крыс подгруппы «Д + вода» и, в тенденции, ниже, чем у крыс в группе «ФР + ИМИ» (рис. 2), что свидетельствовало о нормализующем действии ИМИ на величину показателя. В совокупности, полученные результаты позволяют связать высокий уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс с депрессивноподобным состоянием животных.

Выявлено влияние фактора «Группа» на относительную массу селезенки у крыс после введения препаратов: $F = 4,145$; $p = 0,051$. У крыс, получавших неонатально Д, относительная масса селезенки была снижена. Фактор «Препарат» не оказывал влияния на величину данного показателя и не взаимодействовал с фактором «Группа»: соответственно, $F = 2,760$; $p = 0,108$ и $F = 0,030$; $p = 0,863$. Факторы «Группа» и «Препарат» не оказывали влияния на относительную массу тимуса и надпочечников у крыс опытных и контрольных подгрупп и не взаимодействовали. Относительная масса стресс-компетентных органов приведена в табл. 3.

Таблица 3

Относительная масса органов, вовлеченных в стресс-реакцию (мг/г веса тела), после введения ИМИ/воды крысам, которым в раннем постнатальном периоде вводили ингибитор ДП-IV дипротин А (Д), и контрольным животным, которым вводили физиологический раствор (ФР)

Группы	Органы, вовлеченные в стресс-ответ		
	Селезенка	Тимус	Надпочечники
ФР + ИМИ	3,94 ± 0,31	1,20 ± 0,08	0,17 ± 0,01
ФР + Вода	3,50 ± 0,20	1,37 ± 0,08	0,18 ± 0,01
Д + ИМИ	3,38 ± 0,45	1,36 ± 0,13	0,17 ± 0,01
Д + Вода	2,84 ± 0,12	1,51 ± 0,12	0,19 ± 0,01

В данной серии исследований были воспроизведены описанные ранее [10] нарушения поведения, проявившиеся повышением тревожности и депрессивности у крыс подросткового возраста и взрослых особей, которых подвергали действию ингибитора ДП-IV дипротина А на второй-третьей неделях постнатального развития. У животных опытной группы наблюдали признаки повышения тревожности в возрасте 1 мес., которые не выявлялись у взрослых крыс. Кроме того, крысы опытной группы демонстрировали депрессивно-подобное поведение в тесте принудительного плавания в возрасте 1 и 2 мес. В совокупности результаты свидетельствуют о том, что стойкое, воспроизводимое в разных сериях, смешанное тревожно-депрессивное состояние, которое развивается у крыс после неонатального действия дипротина А, удовлетворяет требованиям одного из критериев валидности моделей эмоционально-мотивационных расстройств на животных — критерия «внешней схожести» (face validity) с клиническим прообразом [14].

Нормализация показателей поведения крыс в тесте принудительного плавания после субхронического действия ИМИ свидетельствует о том, что модель, по крайней мере, по ответу на действие антидепрессанта ИМИ, также удовлетворяет требованиям другого критерия валидности — прогностического критерия (predictive validity). В наших исследованиях ИМИ в условиях субхронического введения снижал вес крыс, что согласуется с данными других исследователей и объясняется тем, что в использованных дозах ИМИ снижает потребление пищи [20]. Кроме того, ИМИ нормализовал уровень кортикостерона у животных, которым в неонатальном периоде вводили Д. Эти данные демонстрируют вовлеченность ГГА-оси в патогенез смешанного тревожно-депрессивного состояния, индуцированного действием Д на второй-третьей неделях постнатального онтогенеза.

С учетом ранее полученных данных о гиперактивации ГГА-оси у животных со смешанным тревожно-депрессивным состоянием, вызванным постнатальным действием другого ингибитора ДП-IV метионил-2(S)-дианоипиролидина [13], и схожести внешних проявлений расстройств на двух моделях [8, 10] можно говорить о том, что нарушение функционирования ГГА-оси является общим механизмом развития этих смешанных тревожно-депрессивных состояний. Результаты работы хорошо согласуются с принятыми представлениями о гиперактивации ГГА-оси в механизмах развития эмоционально-мотивационных расстройств при аверсивных воздействиях, в том числе в раннем возрасте — в период становления нейроэндокринной регуляции организма [21, 22]. В наших исследованиях антидепрессант ИМИ в условиях субхронического введения снижал уровень кортикостеро-

на в плазме крови, что укладывается в представления о подавлении гиперактивности ГГА-оси имидами [23].

ДП-IV может участвовать в регуляции активности ГГА-оси опосредованно, через свои субстраты, к числу которых относится ряд провоспалительных цитокинов [24, 25]. Считается, что воспалительный ответ играет важную роль в патофизиологии депрессии [26, 27]. Так, депрессогенное действие длительного стрессирования сопровождается усилением симпатического тонуса и последующим повышением высвобождения из макрофагов провоспалительных цитокинов [28]. Эти цитокины участвуют в патогенезе расстройств психической деятельности по нескольким путям, в том числе вызывая гиперактивацию ГГА-оси путем снижения эффективности обратной связи за счет уменьшения чувствительности глюкокортикоидных рецепторов [27], с последующим развитием депрессивных расстройств. Выявленное в настоящей работе снижение относительной массы селезенки свидетельствует о нарушении иммунного ответа, что характерно для депрессий [29] и наблюдается при экспериментальном моделировании депрессивно-подобных расстройств [30].

Классический конструкционный критерий валидности модели депрессии (construct validity) предполагает, что наблюдаемые на модели нарушения интерпретируются так же, как при заболевании и находятся в установленной эмпирической и теоретической взаимосвязи с депрессией [14]. Исходя из этого, можно считать, что по наличию признаков нарушения функционирования ГГА-оси и иммунной системы модель смешанного тревожно-депрессивного состояния, индуцированного неонатальным действием ингибитора ДП-IV, удовлетворяет критерию конструкционной валидности.

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют в пользу адекватности модели смешанного тревожно-депрессивного расстройства, возникающего у крыс вследствие действия ингибитора ДП-IV дипротина А на второй-третьей неделях постнатального развития, клиническому прообразу заболевания.

Заключение

В работе показано, что трициклический антидепрессант ИМИ в условиях его субхронического интрагастрального введения в дозе 20 мг/кг крысам с эмоционально-мотивационными расстройствами, возникшими вследствие действия ингибитора ДП-IV в 5-18 постнатальные дни, подавляет депрессивно-подобное поведение животных и снижает уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс.

References

1. Hochberg Z., Feil R., Constancia M., Fraga M., Junien C., Carel J.-C. et al. Child Health, Developmental Plasticity, and Epigenetic Programming. *Endocr. Rev.* 2011. 32(2): 159-224. doi: 10.1210/er.2009-0039
2. Gershon A., Sudheimer K., Tirouvanziam R., Williams L.M., O'Hara R. The long-term impact of early adversity on late-life psychiatric disorders. *Curr. Psychiatry Rep.* 2013; 15(4): 352. doi: 10.1007/s11920-013-0352-9
3. Poletaeva I.I., Perepelkina O.V., Boiarshinova O.S., Lil'p I.G., Markina N.V., Timoshenko T.V. et al. Neonatal injections of pharmacological agents and their remote genotype-dependent effects in mice and rats. *Ontogenez.* 2012; 43(6): 387-400. (in Russian)
4. van Bodegom M., Homberg J.R., Henckens M.J.A.G. Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. *Front. Cell Neurosci.* 2017; 11: 87. doi: 10.3389/fncel.2017.00087
5. Deng J., Lamb J.R., McKeown A.P., Miller S., Murgia P., Guest P.C. et al. Identification of altered dipeptidyl-peptidase activities as potential biomarkers for unipolar depression. *J. Affect. Disord.* 2013; 151(2): 667-72. doi: 10.1016/j.jad.2013.07.015.
6. Neznamov G.G., Zolotov N.N., Syunyakov T.S., Syunyakov S.A., Metlina M.V., Nazarova G.A. Activity of prolyl-specific enzymes in patients with anxiety disorders and its changes during Afobazole treatment. *Psihiatrija i psihofarmakoterapija.* 2014; 16(1): 21-7. (in Russian)
7. Frerker N., Raber K., Bode F., Skripuletz T., Nave H., Klemann C. et al. Phenotyping of congenic dipeptidyl peptidase 4 (DP4) deficient Dark Agouti (DA) rats suggests involvement of DP4 in neuro-, endocrine, and immune functions. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2009; 47(3): 275-87. doi: 10.1515/CCLM.2009.064
8. Krupina N.A., Kushnareva E.Iu., Khlebnikova N.N., Zolotov N.N., Kryzhanovskii G.N. Experimental model of anxiety-depression state in rats exposed to inhibitor of dipeptidyl peptidase IV methionyl-2(S)-cyano-pyrrolidine in early postnatal period. *Zh. Vyssh Nerv Dejat Im I P Pavlova.* 2009; 59(3): 360-372. (in Russian)
9. Khlebnikova N.N., Kushnareva E.Yu., Krupina N.A., Rodina V.I. Novel synthetic inhibitor of dipeptidyl peptidase IV methionyl-2(S)-cyanopyrrolidine induces latent aggression in rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2011; 21(Suppl.3): S302. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-977X\(11\)70477-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-977X(11)70477-1)
10. 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): 167-183. doi: 10.4236/jbbs.2016.64018.
11. 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
12. Krupina N.A., Zubkov E.A., Orshanskaya E.V., Zorkina Y.A., Khlebnikova N.N. Gene expression in the brain of adult rats with behavioural 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
13. Khlebnikova N.N., Krupina N.A., Kushnareva E.Y. Blood serum corticosterone level in modeling depression-like states in rats. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 2013; 4:3-9. (in Russian)
14. Belzung C., Lemoine M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol. Mood Anxiety Disord.* 2011; 1(1):9. doi: 10.1186/2045-5380-1-9.
15. Wolf A.A., Frye Ch.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols.* 2007; 2: 322-28. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.44>.
16. O'Leary, T.P., Gunn, R.K. and Brown, R.E. What are we measuring when we test strain differences in anxiety in mice? *Behavior Genetics.* 2013; 43: 34-50. <http://dx.doi.org/10.1007/s10519-012-9572-8>.
17. Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.* 1978; 47 (4): 379 — 91.
18. Overstreet D.H., Pucilowski O., Rezvani A.H., Janowsky D.S. Administration of antidepressants, diazepam and psychomotor stimulants further confirms the utility of Flinders Sensitive Line rats as an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl).* 1995; 121(1): 27-37.
19. Wang Q., Timberlake M.A. Prall K., Dwivedi Y. The recent progress in animal models of depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2017; 77: 99-109. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.04.008.
20. Mogensen J., Pedersen T.K., Holm S. Effects of chronic imipramine on exploration, locomotion, and food/water intake in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994; 47(3): 427-35. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90139-2](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90139-2)
21. Kasyanov E.D., Mazo G.E. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning in depressive disorder: current state of the problem. *Psihicheskoe zdorov'e.* 2017. 8: 27-34. (in Russian)
22. Anacker C., O'Donnell K.J., Meaney M.J. Early life adversity and the epigenetic programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2014; 16(3): 321-33.
23. Frost P., Bornstein S., Ehrhart-Bornstein M., O'Kirwan F., Hutson C., Heber D. et al. The prototypic antidepressant drug, imipramine, but not Hypericum perforatum (St. John's Wort), reduces HPA-axis function in the rat. *Horm. Metab. Res.* 2003; 35(10): 602-06. doi: 10.1055/s-2003-43507
24. Klemann C., Wagner L., Stephan M., von Horsten S. Cut to the chase: a review of CD26/dipeptidyl peptidase-4's (DPP4) entanglement in the immune system. *Clin. Exp. Immunol.* 2016; 185(1): 1-21, doi: 10.1111/cei.12781
25. Mentlein R. Cell-surface peptidases. *Int. Rev. Cytol.* 2004; 235: 165-213.
26. Raison C.L., Capuron L., Miller A.H. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol.* 2006; 27(1): 24-31. doi: 10.1016/j.it.2005.11.006
27. Oglodek E., Szota A., Just M., Mos D., Araszkie-wicz A. The role of the neuroendocrine and immune systems in the pathogenesis of depression. *Pharmacol. Rep.* 2014; 66(5): 776-81. doi: 10.1016/j.pharep.2014.04.009.
28. Maletic V., Robinson M., Oakes T., Iyengar S., Ball S.G., Russell J. Neurobiology of depression: an integrated view of key findings. *Clin. Pract.* 2007; 61(12): 2030-40. doi: 10.1111/j.1742-1241.2007.01602.x
29. Suzuki H., Savitz J., Kent Teague T., Gandhapudi S.K., Tan C., Misaki M. et al. Altered populations of natural

killer cells, cytotoxic T lymphocytes, and regulatory T cells in major depressive disorder: Association with sleep disturbance. *Brain Behav. Immun.* 2017; 66:193-200. doi: 10.1016/j.bbi.2017.06.011

30. Zhai X.J, Chen F, Chen C, Zhu C.R, Lu Y.N. LC-MS/MS based studies on the anti-depressant effect of hypericin in the chronic unpredictable mild stress rat model. *J. Ethnopharmacol.* 2015;169: 363-9. doi: 10.1016/j.jep.2015.04.053.

Сведения об авторах:

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

© Коллектив авторов, 2017
УДК 577. 2 +616.8-092 +612.821

Грудень М.А.¹, Давыдова Т.В.², Кудрин В.С.³, Наркевич В.Б.³,
Ветрилэ Л.А.², Morozova-Roche L.M.A.⁴, Sewell R.D.E.⁵

Нейропротекторные эффекты антител к глутамату при нарушениях памяти, индуцированных олигомерами провоспалительного белка S100A9, у стареющих животных

¹ ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина», Москва, Россия

² ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

³ ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва, Россия

⁴ Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Umea University, Umea, SE-90187, Sweden

⁵ Cardiff School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Cardiff University, Cardiff, CF10 3NB, UK

Цель исследования — изучение эффектов хронического интраназального введения антител к глутамату совместно с полученными *in vitro* олигомерами провоспалительного белка S100A9 на процесс воспроизведения пространственной памяти, а также на содержание нейромедиаторных аминокислот и биогенных аминов в релевантных структурах мозга — гиппокампе и префронтальной коре у 12-месячных мышей C57Bl/6. **Методика.** В поведенческих экспериментах у всех животных проводили выработку условного рефлекса пассивного избегания и тестировали воспроизведение памятного следа, после этого в нейрохимическом исследовании в гиппокампе и префронтальной коре методом ВЖХ проводили определение концентрации нейромедиаторных аминокислот и биогенных аминов. **Результаты.** Показано, что введение белка S100A9 олигомеров индивидуально приводило к нарушению воспроизведения памятного следа, а в сочетании с антителами к глутамату данного эффекта выявлено не было. Обнаружено значительное повышение концентрации глутамата в обеих церебральных структурах стареющих животных при действии S100A9 олигомеров и снижение содержания аминокислоты при совместном введении с антителами к глутамату до нормы. Показано существенное снижение содержания дофамина в гиппокампе и префронтальной коре в условиях влияния S100A9 олигомеров, а также повышение уровня его метаболитов в гиппокампе с нормализацией обмена дофамина в присутствии антител к глутамату. **Заключение.** Выявленные антиамнестические эффекты антител к глутамату и нормализация нейрохимического профиля в условиях вызванной центральной токсичностью S100A9 олигомерами могут быть использованы в разработках подходов нейропротективной коррекции в том числе при болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: обучение, память, амнезия, УРПИ, белок S100A9, олигомеры, антитела к глутамату, аминокислоты, моноамины, гиппокамп, префронтальная кора, нейропротекция.

Для цитирования: Грудень М.А., Давыдова Т.В., Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Ветрилэ Л.А., Morozova-Roche L.M.A., Sewell R.D.E. Нейропротекторные эффекты антител к глутамату при нарушениях памяти, индуцированных олигомерами провоспалительного белка S100A9, у стареющих животных. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 2017; 61(4): 13—20. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8518

Для корреспонденции: Грудень Марина Алексеевна, вед. науч. сотр., канд. хим. наук, лаборатория функциональной нейрохимии ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им.П.К.Анохина» e-mail: mgruden@mail.ru

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 22.08.2017

Gruden M.A.^{*1}, Davydova T.V.², Kudrin V.S.³, Narkevich V.B.³, Vetriele L.A.²,
Morozova-Roche L.A.⁴, Sewell R.D.E.⁵

Neuroprotective effects of glutamate antibodies on memory impairment induced by proinflammatory S100A9 protein oligomers in aging animals

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution «P.K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology», Moscow, Russia

² Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of General Pathology and Pathophysiology», Moscow, Russia

³ Federal State Budgetary Scientific Institution «V.V. Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russia

⁴ Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Umea University, Umea, SE-90187, Sweden

⁵ Cardiff School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Cardiff University, Cardiff, CF10 3NB, UK

The **aim** of this study was to investigate effects of chronic intranasal administration of glutamate antibodies with *in vitro*-generated proinflammatory S100A9 protein oligomers, on spatial memory of 12-month old C57Bl/6 mice. In addition, the brain content of neurotransmitter amino acids and biogenic amines was monitored in memory-relevant brain structures (hippocampus and prefrontal cortex) of these animals. **Methods.** In behavioral experiments, all animals were conditioned in a passive avoidance reflex test and the memory trace was evaluated. In a simultaneous neurochemical study, HPLC-electrochemical detection analysis was performed to measure concentrations of neurotransmitter amino acids and biogenic amines in the hippocampus and prefrontal cortex. **Results.** Administration of S100A9 oligomers alone resulted in disruption of the memory trace retrieval whereas their combination with glutamate antibodies abolished this memory disorder. Significant increases in glutamate concentration were observed in both of the cerebral structures of ageing animals in response to S100A9 oligomers alone, and there was a reduction of the amino acid levels when coadministered with glutamate antibodies. S100A9 oligomers also evoked a decrease in hippocampal and prefrontal cortical dopamine and synchronously elevated dopamine metabolite concentrations, both of these actions being normalized by glutamate antibody coadministration. **Conclusion.** Disclosure of the anti-amnesic effects of glutamate antibodies, along with their neurochemical stabilizing activity to S100A9 oligomer neurotoxicity might be utilized in the development of neuroprotective approaches in Alzheimer's disease.

Keywords: training, memory, amnesia, passive avoidance reflex test, S100A9 protein, oligomers, antibodies to glutamate, amino acids, monoamines, hippocampus, prefrontal cortex, neuroprotection.

For citation: Gruden M.A., Davydova T.V., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Morozova-Roche L.A., Sewell R.D.E. Neuroprotective effects of glutamate antibodies on memory impairment induced by proinflammatory S100A9 protein oligomers in aging animals. *Patologicheskaya Fiziologia i Eksperimental'naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*, 2017; 61(4): 13—20 (in Russian). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8518

For correspondence: Gruden Marina Alekseevna, Leading Researcher, Cand. of Chemistry Sciences, Laboratory of Functional Neurochemistry, FSBSI «Research Institute of Normal Physiology named after PK Anokhin» e-mail: mgruden@mail.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Davydova T.V. <http://orcid.org/0000-0002-3176-1035>

Morozova-Roche L. <http://orcid.org/0000-0001-5886-2023>

Sewell R. <http://orcid.org/0000-0003-1702-5100>

Received 22.08.2017

Введение

Нейродегенеративные заболевания, к которым относится болезнь Альцгеймера (БА) в настоящее время выходят на лидирующие позиции в общей структуре заболеваемости населения большинства развитых стран. К наиболее тяжелым последствиям нейродегенерации по альцгеймеровскому типу можно отнести прогрессирующее снижение когнитивных функций с развитием деменции, что ведет к инвалидизации и социальной дезадаптации пациентов с БА [1]. Механизм развития данной патологии до конца не ясен, и эффективной комплексной терапии, направленной на устранение или замедление развития нейродегенеративных процессов при БА на сегодняшний день нет. Среди основных причин запуска патологического нейродегенеративного процесса рассматривают конформационные нарушения функционально значимых белков нервной системы, приводящие к образованию токсических амилоидогенных олигомерных и фибриллярных структур, которые могут индуцировать программируемую гибель (апоптоз) нервных и глиальных клеток мозга [2]. При БА обнаружено нарушение процесса сворачивания $A\beta_{1-42}$ пептида, приводя-

щее к образованию и последующему отложению в паренхиме головного мозга белковых агрегатов, которые вызывают апоптоз нейронов в церебральных структурах принимающих непосредственное участие в процессах обучения и памяти [3, 4].

В последнее время особый интерес вызывает изучение роли воспаления при БА как инициаторной фазы нарушения сворачивания белков и последующей нейродегенерации [5]. Среди молекулярных факторов, участвующих в воспалительных реакциях пристальное внимание уделяется провоспалительному белку S100A9, который колокализуется с $A\beta_{1-42}$ пептидом в мозге и рассматривается в качестве биомаркера раннего когнитивного дефицита при БА [6]. Обнаружено повышение экспрессии гена белка S100A9 в клетках микроглии височной коры головного мозга, как при генетически опосредованных, так и спорадических случаях БА. Показано, что в определенных условиях *in vivo* и *in vitro* S100A9 может формировать токсические амилоидогенные олигомерные и фибриллярные структуры, вызывающие гибель клеток в мозге [6]. Интересно отметить, что на моде-

ли БА при введении половозрелым крысам Вистар в ядра Мейнерта нейротоксического фрагмента A β ₂₅₋₃₅, вызывающего нарушение выработки условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ), было продемонстрировано, что антитела к глутамату (АТ-ГЛУ) в дозе 250 мкг/кг обладают выраженными антиамнестическими свойствами [7]. В наших исследованиях было обнаружено, что хроническое интраназальное введение S100A9 фибриллярных структур индуцировало нарушение выработки УРПИ у стареющих мышей C57Bl/6, при этом, введение S100A9 фибрилл совместно с очищенными моноспецифическими АТ-ГЛУ не приводило к нарушению памяти у животных, что может дополнительно свидетельствовать об антиамнестической направленности АТ-ГЛУ [8]. Научный и практический интерес представляет изучение нейрохимических механизмов протективного действия АТ-ГЛУ в условиях амнезии, вызванной белковыми агрегатами в целом, и в частности, олигомерными формами белка S100A9, обладающими более выраженной по сравнению с фибриллами S100A9 нейротоксичностью.

Цель исследования — изучение эффектов хронического интраназального введения антител к глутамату совместно с полученными *in vitro* олигомерами провоспалительного белка S100A9 на процесс воспроизведения пространственной памяти, а также на содержание нейромедиаторных аминокислот и биогенных аминов в релевантных структурах мозга — гиппокампе и префронтальной коре у 12-месячных мышей C57Bl/6.

Методика

Эксперименты выполнены на 36 самцах мышей линии C57Bl/6 массой $31,6 \pm 0,4$ г в возрасте 12 мес. Животные содержались в стандартных условиях вивария при 12-часовом световом режиме и свободном доступе к пище и воде. При работе с мышами соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

Согласно разработанному протоколу было сформировано 3 группы животных, которым интраназально поочередно в каждую ноздрю в течение 14 суток вводили: 1-й гр. — физиологический раствор в объеме 4 мкл (контрольная группа); 2-й гр. — структуры белка S100A9 (0,48 мг/кг 4 мкл); 3-й гр. — одновременно в различные ноздри олигомерные структуры белка S100A9 (0,48 мг/кг, 4 мкл) и АТ-ГЛУ (250 мкг/кг, 4 мкл).

Для получения S100A9 олигомерных структур нативный белок S100A9 экспрессировали в *E. Coli* по протоколу, описанному ранее [8]. Концентрацию белка S100A9 в растворе определяли на ND-1000 спектрофотометре (Nano-drop, Sweden), используя коэф-

фициент экстинкции $\epsilon_{280} = 0,53$ (мг/мл)⁻¹ см⁻¹. Протокол получения фракций олигомеров белка S100A9 состоял из нескольких этапов. На первом этапе для удаления из раствора S100A9 преагрегатов, нативный белок растворяли в 10 мМ PBS буфере, рН 7,4, подвергали последовательно обработке ультразвуком в течение 15 мин, затем центрифугированию при 14 000 об/мин на микроцентрифуге (Eppendorf Centrifuge 5417R), собирали супернатант из верхнего слоя раствора и фильтровали через 0,22 мм фильтры (Millex, USA). Белковый раствор в конечной концентрации 2,0 мг/мл в 10 мМ PBS буфере, рН 7,4 инкубировали при 37°C и непрерывном перемешивании при 600 об./мин на шейкере (Eppendorf Thermomixer Compact) в течение 2 ч. Образование S100A9 амилоидных олигомеров контролировали с помощью спектральных методов анализа по кинетике связывания тиреофлавина Т (ThT) с амилоидными структурами на флуоресцентном спектрофотометре Jasco FP-6500 (Jasco, Japan) при длине волны 440 нм и анализировали пики при 450—550 нм с шагом в 3 нм. Кроме того, было использовано окрашивание красителем Конго красным и измерение оптической абсорбции амилоидных структур на спектрофотометре ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA). Морфологию олигомерных структур определяли атомно-силовой микроскопией (АСМ), используя PICO PLUS микроскоп (Agilent, USA). Для проведения амилоидного межсекционного анализа использовали PICO PLUS software (Agilent, USA) [9].

Для получения препарата АТ-ГЛУ первоначально проводили иммунизацию 3 половозрелых самцов кроликов породы Шиншилла конъюгатом глутамата с белком носителем — бычьим сывороточным альбумином (БСА) по схеме, описанной [10]. Данный конъюгат был синтезирован с использованием бифункционального реагента — глутарового альдегида и очищен по ранее описанной методике [11].

После забора крови у животных на 7-е сут. после завершения иммунизации получали сыворотку крови из которой последовательно выделяли γ -глобулиновую фракцию, содержащую АТ-ГЛУ путем пересадения сульфатом аммония 50% насыщения с последующим диализом против PBS буфера рН 7,4 [12]. Для освобождения от примеси антител против БСА в выделенной общей γ -глобулиновой фракции применяли аффинную хроматографию с использованием синтезированного сорбента на основе ВrCN-активированной сефарозе-4В и иммобилизованного на ней БСА [12]. Очищенную от примеси антител к БСА γ -глобулиновую фракцию собирали и определяли в ней титр АТ-ГЛУ методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) путем последовательного разведения раствора АТ-ГЛУ и использо-

вания в качестве тест-антигена синтезированного конъюгата глутамата с гетерологичным белком — γ -глобулином лошади, полученным по методу [11]. Документировано, что титр АТ-ГЛУ составил $1:1024 \pm 1:16$. Очищенную фракцию АТ-ГЛУ разливали по аликвотам и лиофилизировали с последующим хранением при $+4^\circ\text{C}$.

В поведенческих экспериментах на 15-е сут. от начала введения раствора S100A9 олигомеров вырабатывали условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ) у мышей в камере, состоящей из двух отсеков: светлого ($15,5 \times 15,5 \times 19$ см) и темного ($9 \times 9 \times 17$ см). В каждый отсек был вмонтирован пол из металлических стержней диаметром в 0,3 см и расстоянием в 0,9 см между ними. Отсеки соединялись между собой отверстием в общей стенке, снабженным гильотиной дверцей. В 1-й день животных помещали индивидуально в светлый отсек, освещенный яркой лампой в 100 Вт и позволяли ознакомиться с камерой в течение 60 с. После ознакомления мышей с камерой открывали дверцу между светлым и темным отсеками, при этом животное, в силу свойственного грызунам врожденного норкового рефлекса, переходило в темную часть камеры, регистрировалось время данного перехода (ЛП₁). При заходе мыши в темный отсек четырьмя лапами и на 2/3 хвоста, дверь между отсеками закрывали и наносили электрокожное раздражение силой в 0,3 мА в течение 1 с, после чего животное сразу вынимали и помещали в домашнюю клетку. Через 24 ч проводили сеанс тестирования выработанного навыка. Для этого животное помещали в освещенный отсек на 30 с для ознакомления, затем дверцу открывали и фиксировали время перехода в темную камеру (ЛП₂). Период наблюдения за животным составляло 300 с (с момента открытия дверцы в дни обучения и тестирования). Степень запоминания животными действия электрошока определяли по разности латентных периодов перехода животного в темную камеру при выработке УРПИ и через 24 ч после обучения в день тестирования (ДЛП, с).

По окончании поведенческих экспериментов, всех мышей декапитуировали и проводили на холоду забор церебральных структур (гиппокампа и префронтальной коры), которые хранили в жидком азоте до использования. Далее в образцах гиппокампа и префронтальной коры определяли содержание биогенных аминов (норадреналина, дофамина, серотонина), их метаболитов, а также нейромедиаторных аминокислот (аспартата, глутамата, глицина, таурина, ГАМК). Уровень моноаминов и их метаболитов в структурах мозга мышей определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЖХ) с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, West Lafayette, США) с инжектором Rheodyne 7125, с объ-

емом петли для нанесения образцов в 20 мкл [8]. Изучаемые вещества разделяли на обращенно-фазной колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4×100 мм, размер частиц 3 мкм (Dr.Majsch GMBH, «Элсико», Москва). Насос РМ-80 (BAS, США) при скорости элюции подвижной фазы 1,0 мл/мин и давлении 2 бара. Мобильная фаза состояла из: 0,1 М цитратно-фосфатного буфера, 1,1 мМ октансульфоновой кислоты, 0,1 мМ ЭДТА и 9% ацетонитрила (рН 3,0). Перед каждым хроматографическим определением мобильную фазу фильтровали с помощью вакуумного насоса через целлюлозные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм при давлении в 20—40 мм рт. ст. и тщательно дегазировали под вакуумом с одновременной обработкой на ультразвуковой бане («Серьга», Россия) в течение 40—50 с. Измерение проводили на стеклоугольном электроде ($+0,85$ V) в режиме сравнения с электродом Ag/AgCl. Для количественного определения моноаминов в структурах мозга крыс использовали раствор внутреннего стандарта в концентрации 500 пкмоль/мл, содержащий диоксибензиламин (ДОБА), норадреналин (НА), L-3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА), 3,4-дигидроксифенилуксусную кислоту (ДОФУК), дофамин (ДА), гомованилиновую кислоту (ГВК), 5-гидрокситриптофан (5-ОТФ), 5-гидрокситриптамин (5-ОТ), 5-оксииндолуксусную кислоту (5-ОИУК). Величины концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали методом «внутреннего стандарта», исходя из отношений площадей пиков в стандартной смеси и в экспериментальном образце, результаты выражали в нмоль/г ткани.

Содержание нейромедиаторных аминокислот определяли методом ВЭЖХ/ЭД согласно стандартной методике [13]. Поскольку аминокислоты в нативной форме являются очень слабыми хромофорами (не поглощаются УФ спектром) и не проявляют электрохимической активности, для их детекции необходимо предварительное проведение их химического модифицирования — дериватизации. Для этого использовали ортафталевоый альдегид (ОФА) (Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) флуоресцирующий при связывании с аминокислотой. В качестве стандартной смеси для калибровки колонки с сорбентом использовали раствор смеси аспарагиновой и глутаминовой кислот, таурина и ГАМК в концентрации 0,1 мкМ/мл в 0,1 н. HClO₄. Через 15 мин после инкубации пробы при комнатной температуре, 20 мкл раствора наносили на колонку Agilent Hypersil ODS 5 мкМ, $4,6 \times 250$ мм. Регистрацию продуктов разделения проводили на флуоресцентном детекторе Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) при длине волны возбуждения 230 нм и волны эмиссии 392 нм. Мобильная фаза состояла из 0,05 М фосфатного буфера (рН 5,6) с 0,025 мМ ЭДТА и 5% ацетонитрила. Мобильную фазу фильтровали с помощью вакуумного насоса через

целлюлозный фильтр (диаметр пор — 0,02 мкм) и перед каждым хроматографическим определением тщательно дегазировали под вакуумом аналогично выше описанному методу. Разделение образцов проводили при скорости подвижной фазы 1,5 мл/мин.

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Statistica 6.0 с применением однофакторного непараметрического дисперсионного анализа по Kruskal-Wallis с последующим внутригрупповым сравнением по U-критерию Mann-Whitney.

Результаты и обсуждение

Образцы конформационных структур белка S100A9, содержащие амилоидные олигомеры были получены через 2 ч от начала инкубации нативного белка в условиях, описанных выше. Образование S100A9 олигомеров контролировалось по увеличению в 1,3 раза ThT флуоресценции по сравнению с свежеприготовленным раствором нативного белка S100A9. По данным АСМ с последующим анализом структурных имиджей, S100A9 олигомеры морфологически были охарактеризованы как структуры округлой формы с средней высотой от 1,5 до 2,0 нм, измеренной поперечными сечениями АСМ (рис. 1).

В результате проведенных поведенческих экспериментов с стареющими животными, которым хронически интраназально вводили S100A9 олигомеры индивидуально или в комбинации с АТ-ГЛУ выявлены существенные различия между исследуемыми группами и контролем по показателям ЛП1 Н (2, N = 30) = 15,72 ρ = 0,0004, ЛП2 Н (2, N = 30) = 19,43 ρ = 0,0001 и ЛП Н (2, N = 30) = 8,69 ρ = 0,01. Полученные результаты представлены на рис. 2.

Обнаружено, что через 14 сут. от начала интраназального введения раствора S100A9 олигомеров у 12-месячных мышей документированы выраженные нарушения пространственной памяти при выработке у животных условного рефлекса пассивного избегания. Данные нарушения выражались в снижении латентного времени захода животных в темную камеру при воспроизведении УРПИ через 24 ч после обучения, а также в уменьшении степени запоминания (Δ ЛП) по сравнению с контролем по U критерию ($\rho < 0,05$). Следует также отметить, что у стареющих животных, получавших S100A9 олигомеры наблюдали в первый день обучения в УРПИ увеличение латентного времени (ЛП1) по сравнению с контролем и группой мышей, получавших S100A9 олигомеры совместно с АТ-ГЛУ. В группе мышей после интраназального совместного введения S100A9 олигомеров и АТ-ГЛУ было выявлено, что через 14 сут. после введения веществ при выработке УРПИ степень запо-

минания (Δ ЛП) у животных не отличалась от контроля. Показано, что хроническое интраназальное введение АТ-ГЛУ совместно с S100A9 олигомерами уменьшало мнестический дефицит, индуцированный введением S100A9 олигомеров, более чем в 9 раз. Используемая в работе поведенческая модель УРПИ предназначена для изучения процессов связанных с воспроизведением памятного следа, и, исходя из этого, можно предположить, что токсические олигомерные структуры белка S100A9 вызывают амнезию на этапе воспроизведения памятного следа, связанного с болевым раздражением, нанесенным в первый день обучения. Учитывая, что белок S100A9 является активным участником процессов воспаления, образующиеся в естественных условиях токсические олигомеры при повышенной экспрессии самого белка, могут также инициировать при их хроническом введении процессы локального воспаления в мозге жи-

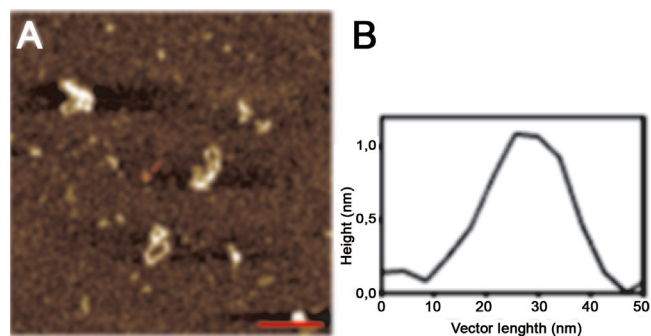


Рис. 1. А — изображение S100A олигомеров, полученных атомно-силовой микроскопией; В — уровень флуоресценции при связывании S100A олигомеров с тиафлавином Т.

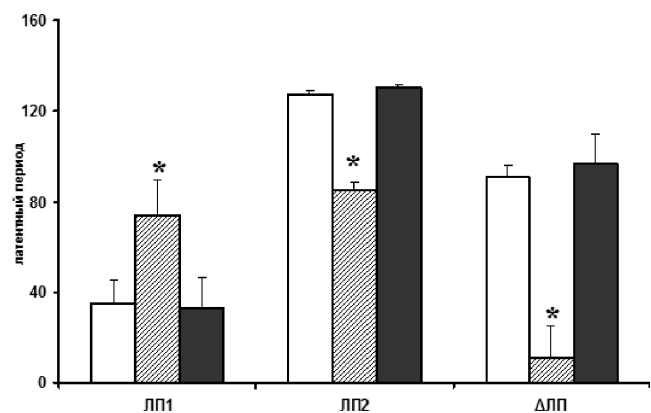


Рис. 2. Влияние 14-дневного интраназального введения физиологического раствора, S100A9 олигомеров индивидуально и совместно с антителами к глутамату на выработку УРПИ у стареющих мышей C57Bl/6.

Белые столбики — контрольная группа мышей C57Bl/6 (физиологический раствор), заштрихованные столбики — группа мышей C57Bl/6, получавшая олигомеры белка S100A9, темные столбики — группа мышей C57Bl/6, получавшая олигомеры S100A9 вместе с АТ-ГЛУ. ЛП1 — латентное время обучения, ЛП2 — латентное время воспроизведения УРПИ, Δ ЛП — латентное время степени запоминания. * $\rho < 0,05$ по сравнению с контрольной группой мышей.

вотных, отягощая течение мнестических процессов. В условиях сочетанного введения S100A9 олигомеров и АТ-ГЛУ, наблюдается эффект сохранения памятного следа у экспериментальных животных, что позволяет предположить наличие антиамнестических свойств препарата АТ-ГЛУ. Представленные в работе результаты дополняют ранее установленные факты, свидетельствующие, что введение S100A9 фибрилл совместно с очищенными моноспецифическими АТ-ГЛУ не приводило к нарушению памяти у животных на модели УРПИ, что мо-

жет дополнительно свидетельствовать об антиамнестической направленности используемых АТ-ГЛУ [14].

Изучение нейрохимических механизмов, вовлеченных в процессы памяти и нарушающиеся при действии токсических S100A9 олигомеров является одной из задач данной работы. С этой целью по окончании поведенческих экспериментов у всех мышей в релевантных структурах мозга, а именно гиппокампе и префронтальной коре проводили количественное определение содержания нейромедиаторных аминокислот и моноаминов. При сравнительном нейрохимическом анализе содержания аминокислотного паттерна в гиппокампе и префронтальной коре в группе мышей, получавших S100A9 олигомеры, обнаружено повышение по сравнению с контрольной группой животных уровня глутаминовой кислоты в обеих структурах на 47% и 80% соответственно (рис. 3).

При этом в гиппокампе у этих животных уровень аспарагиновой кислоты, глицина, таурина и ГАМК значительно не изменялся. В префронтальной коре у мышей после введения S100A9 олигомеров наблюдали снижение в 2 раза концентрации аспарагиновой кислоты и значительное повышение концентрации таурина более чем на 60% от уровня аминокислоты в данной структуре мозга у животных, получавших физиологический раствор (рис. 3). Вероятно, повышение концентрации таурина в префронтальной коре напрямую связано с амнестическими эффектами S100A9 олигомеров, так как таурин является тормозящим нейротрансмиттером с нейромодулирующим и нейрозащитным действием [15]. При этом таурин может усилить функцию ГАМК, образуя с ГАМК механизм, защищающий от избыточного количества возбуждающих нейротрансмиттеров [15, 16]. Показано, что сочетанное введение S100A9 олигомеров и АТ-ГЛУ приводило к снижению концентрации глутаминовой кислоты на 30% в гиппокампе и незначительно до 17% — в префронтальной коре мозга у стареющих мышей. При этом в этой группе животных влияния на содержание таурина в префронтальной коре выявлено не было. У данных животных отмечено сопоставимое с группой животных, получавших S100A9 олигомеры, повышенное по сравнению с контролем содержание этой серосодержащей аминокислоты (рис. 3). Данные свидетельствуют, что даже в условиях связывания АТ-ГЛУ избытка глутаминовой кислоты механизм иммунной защиты от возбуждающих аминокислот сохраняет свою активность. Описано, что чрезмерное высвобождение глутамата является ключевым фактором, влияющим на повреждение нейронов при некоторых неврологических заболеваниях [17]. Кроме того, глутамат является распространенным возбуждающим нейротрансмиттером в ЦНС млекопитающих, и играет важную роль как в физиологических функциях мозга, так и в патологии [18, 19]. Известно так-

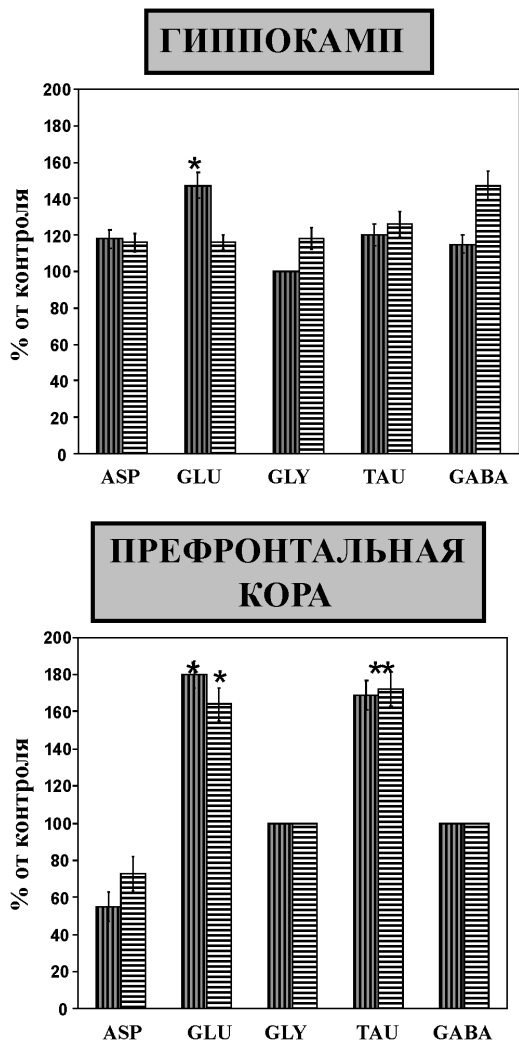


Рис. 3. Содержание аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, глицина, таурина и ГАМК в гиппокампе и префронтальной коре стареющих мышей C57Bl/6 после 14-дневного интраназального введения S100A9 олигомеров индивидуально и совместно с антителами к глутамату. Результаты представлены в % от контроля. Контроль принят за 100%. Заштрихованные темные столбики — группа мышей C57Bl/6, получавшая олигомеры белка S100A9, заштрихованные светлые столбики — группа мышей C57Bl/6, получавшая S100A9 олигомеры вместе с АТ-ГЛУ. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой мышей; ** $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой мышей.

же, что глутамат может регулировать молекулярные и клеточные процессы, такие, как нейрогенез, рост нейритов, синаптогенез и апоптоз [20]. Более того, было установлено, что некоторые из важнейших функций мозга, включая обучение и память, зависят от высвобождения синаптического глутамата [19]. При этом повышенный уровень внеклеточного глутамата может вызывать гибель нейронов, и это явление, называемое «эксцитотоксичность», является звеном патогенеза многих неврологических заболеваний, где нарушается нормальная активность ЦНС [21, 22]. Амнезия, наблюдаемая на модели УРПИ и вызванная действием S100A9 олигомерами, может напрямую быть связана с явлением эксцитотоксичности, а амнестический эффект АТ-ГЛУ — с ослаблением проявлений эксцитотоксичности, путем связывания избыточного глутамата в структурах мозга. С другой стороны, определение содержания моноаминов в изучаемых структурах мозга у стареющих мышей выявило отличный по специфичности профиль концентрации моноаминов и их метаболитов в изучаемых структурах мозга, вовлеченных в обеспечение механизмов формирования памяти в условиях УРПИ. Так, в гиппокампе и префронтальной коре не выявлено существенных изменений в концентрации норадреналина, 5-НТ и его метаболитов у мышей в группах как с индивидуальным введением S100A9 олигомеров, так и при их совместном введении с АТ-ГЛУ, по сравнению с животными, получившими физиологический раствор. При этом в гиппокампе стареющих мышей после интраназального введения выявлены элементы дисбаланса дофаминергической системы мозга. Так, концентрация дофамина статистически значимо (более чем на 50%) снижена с одновременным увеличением содержания его метаболита DOPAC более чем в 2—2,5 раза по сравнению с контролем. Интересно отметить, что соотношения метаболитов дофамина и самого дофамина изменяется следующим образом по сравнению с таковыми в гиппокампе контрольных животных и составляет: DOPAC/DA — 250%, DA — 260% (рис. 4).

Как видно из рис. 4, в префронтальной коре введение S100A9 олигомеров также вызывает снижение концентрации дофамина на 50—60% от контрольного уровня, но не инициирует изменения содержания его метаболитов DOPAC и HVA. Новые нейрохимические данные были получены при хроническом совместном введении мышам S100A9 олигомеров и АТ-ГЛУ. Обнаружено, что в присутствии АТ-ГЛУ не наблюдается снижение дофамина как в гиппокампе, так и в префронтальной коре, а также изменения концентрации метаболитов и их оборота (рис. 4). Сами белковые ансамбли S100A9 с нарушенной конформацией в виде агрегатов, с одной стороны, и сигнал воспаления с другой стороны, приводят к дисбалансу нейромедиаторных систем мозга, модифицируя дофаминергическую систе-

му, которая напрямую вовлечена в механизмы обучения и памяти [23]. Взаимная дисрегуляция глутаминергической и дофаминергической систем в условиях действия токсических белковых олигомеров белка S100A9 может служить нейрохимической основой нарушения воспроизведения памятного следа у стареющих животных.

Таким образом, обнаружено амнестическое влияние S100A9 олигомеров на процессы формирования пространственной памяти на модели УРПИ, а также нейропротективное влияние антител к глутамату. В условиях вызванной амнезии документирован дисбаланс глутаматергической и дофаминергической систем, связанный с повышением концентрации глутамата и одновременным снижением уровня дофамина в мозге у стареющих животных.

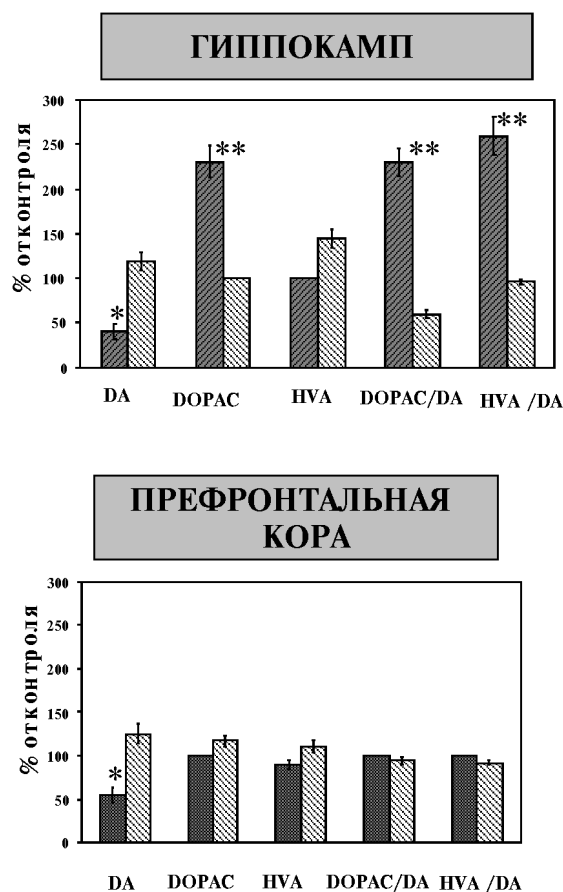


Рис. 4. Содержание норадреналина, дофамина, серотонина и их метаболитов, а также их оборота в гиппокампе и префронтальной коре стареющих мышей C57Bl/6 после 14-дневного интраназального введения олигомеров S100A9 индивидуально или совместно с антителами к глутамату. Результаты представлены в % от контроля. Контроль принят за 100%; заштрихованные темные столбики — группа мышей C57Bl/6, получавшая олигомеры белка S100A9, заштрихованные светлые столбики — группа мышей C57Bl/6, получавшая олигомеры S100A9 вместе с АТ-ГЛУ. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой мышей; ** $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой мышей.

References

- De-Paula VJ, Radanovic M, Diniz BS, Forlenza OV. Alzheimer's disease. *Subcell Biochem.* 2012; 65: 329-52. doi: 10.1007/978-94-007-5416-4_14.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 2002; 298(5594): 789-91. doi: 10.1126/science.1074069
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297: 353-6. doi: 10.1126/science.1072994.
- Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(R1):R12-20. doi: 10.1093
- Calsolaro V, Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current evidence and future directions. *Alzheimers Dement.* 2016; 12(6): 719-32. doi: 10.1016/j.jalz.2016.02.010.
- Wang C, Klechikov AG, Gharibyan AL, Warmlander SK, Jarvet J, Zhao L, Jia X, Narayana VK, Shankar SK, Olofsson A, Brannstrom T, Mu Y, Graslund A, Morozova-Roche LA. The role of pro-inflammatory S100A9 in Alzheimer's disease amyloid-neuroinflammatory cascade. *Acta Neuropathol.* 2014; 127: 507-22. doi: 10.1007/s00401-013-1208-4.
- Gorbatov VY, Trekova NA, Fomina VG, Davydova TV. Anti-amnesic effects of antibodies to glutamate in experimental Alzheimer's disease. *Bull Exp Biol Med.* 2010; 150: 23-5. doi:10.1007/s10517-010-1058-1.
- Gruden MA, Davidova TV, Yanamandra K, Kucheryanu VG, Morozova-Roche LA, Sherstnev VV, Sewell RD. The misfolded pro-inflammatory protein S100A9 disrupts memory via neurochemical remodelling instigating an Alzheimer's disease-like cognitive deficit. *Behav Brain Res.* 2016; 306: 106-16. doi: 10.1016/j.bbr.2016.03.016.
- Gruden MA, Davydova TV, Wang C, Narkevich VB, Fomina VG, Kudrin VS, Morozova-Roche LA, Sewell RDE. Nasal inoculation with α -synuclein aggregates evokes rigidity, locomotor deficits and immunity to such misfolded species as well as dopamine. *Behav Brain Res.* 2013; 243: 205-12. doi: 10.1016/j.bbr.2013.01.011. Epub 2013 Jan 17.
- Davydova T.V., Basharova L.A., Kovalyov I.E., Evseev V.A. Suppression of alcohol consumption at induction of synthesis of antibodies to serotonin. *Pharmakol. Toksikol.* 1987; 50(2): 57-8. (in Russian)
- Seguela P, Geffard M, Buijs RM, Le Moal M. Antibodies against gamma-aminobutyric acid: specificity studies and immunocytochemical results. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1984; 81: 3888-92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC345327>
- Immunological methods.* edited by H. Friemel. Medicine 1987. (in Russian)
- Pearson S.J., Crudek C., Mercer K. et al. Electrochemical detection of human brain transmitter amino acids by high-performance liquid chromatography of stable o-phthalaldehyde – sulphite derivatives. *J. Neural Transm.* 1991; 86: 151-7.
- Gruden MA, Davydova TV, Fomina VG, Vetrile LA, Morozova-Roche LA, Sewell RD. Antibodies to Glutamate Reversed the Amnesic Effects of Proinflammatory S100A9 Protein Fibrils in Aged C57Bl/6 Mice. *Bull Exp Biol Med.* 2017; 162(4): 430-2. doi: 10.1007/s10517-017-3632-2.
- Kim HY, Kim HV, Yoon JH, Kang BR, Cho SM, Lee S, Kim JY, Kim JW, Cho Y, Woo J, Kim Y. Taurine in drinking water recovers learning and memory in the adult APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 2014 Dec 12;4:7467. doi: 10.1038/srep07467.
- Suarez LM, Munoz MD, Martin Del Rio R, Solis JM. Taurine content in different brain structures during ageing: effect on hippocampal synaptic plasticity. *Amino Acids.* 2016;48(5):1199-208. doi: 10.1007/s00726-015-2155-2.
- Duan Y, Wang Z, Zhang H, He Y, Fan R, Cheng Y, Sun G, Sun X. Extremely low frequency electromagnetic field exposure causes cognitive impairment associated with alteration of the glutamate level, MAPK pathway activation and decreased CREB phosphorylation in mice hippocampus: reversal by procyanidins extracted from the lotus seedpod. *Food Funct.* 2014; 5: 2289-97. doi: 10.1039/c4fo00250d.
- Mattson MP. Glutamate and Neurotrophic Factors in Neuronal Plasticity and Disease. *Ann NY Acad Sci.* 2008., 1144: 97-112. doi: 10.1196/annals.1418.005
- Wang H, Peng R-Y. Basic roles of key molecules connected with NMDAR signaling pathway on regulating learning and memory and synaptic plasticity. *Mil Med Res.* 2016; 3(1): 26. doi: 10.1186/s40779-016-0095-0.
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RGM. Synaptic plasticity and memory: an Evaluation of the hypothesis. *Ann Rev Neurosci.* 2000;23:649-711. doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.649.
- Atlante A, Calissano P, Bobba A, Giannattasio S, Marra E, Passarella S. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett.* 2001;497:1-5. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02437-1.
- Yang JL, Sykora P, Wilson DM 3rd, Mattson MP, Bohr VA. The excitatory neurotransmitter glutamate stimulates DNA repair to increase neuronal resiliency. *Mech Ageing Dev.* 2011;132:405-411. doi: 10.1016/j.mad.2011.06.005.
- Kushida S, Kimoto K, Hori N, Toyoda M, Karasawa N, Yamamoto T, Kojo A, Onozuka M. Soft-diet feeding decreases dopamine release and impairs aversion learning in Alzheimer model rats. *Neurosci Lett.* 2008 Jul 11;439(2):208-11. doi: 10.1016/j.neulet.2008.05.017.

Сведения об авторах:

Давыдова Татьяна Викторовна доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаборатории общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Кудрин Владимир Сергеевич, к.м.н., зав. лаб. нейрохимической фармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»

Наркевич Виктор Борисович с.н.с., лаб. нейрозимической фармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»

Ветрилэ Лучия Александровна, к.м.н., вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Ludmila A. Morozova-Roche, Professor, Umea University, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Umea SE 90781, Sweden

Robert D. Sewell, Professor, Cardiff School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Cardiff University, Cardiff, CF10 3NB, UK

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.69-008.6

Дробленков А.В.¹, Прошина Л.Г.², Юхлина Ю.Н.¹, Байрамов А.А.¹, Шабанов П.Д.¹, Никитина И.Л.¹

Тестостерон-зависимые изменения нейронов аркуатного ядра гипоталамуса и их обратимость при моделировании мужского гипогонадизма

¹ ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Россия, 197341, г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

² ФГБОУ ВПО «Новгородский государственный университет им. Ярослава Мудрого» Министерства образования и науки РФ, Россия, 173003, г. Великий Новгород, ул. Большая Санкт-Петербургская, д. 41

Актуальность. Значение недостаточности тестостерона для структурного гомеостаза нейронов, регулирующих выработку гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ) и синтезирующих данный гормон, мало изучены. **Цель.** Установить реактивные изменения, количество рецепторов к андрогенам (АР) и особенности их распределения в нейронах медиального аркуатного ядра гипоталамуса (МАЯ) при экспериментальном гипогонадизме, а также обратимость этих изменений после восстановительной терапии тестостероном. **Методы.** У самцов крыс Вистар (16 особей) моделировали гипогонадизм путем удаления одной гонады на 2—3 день постнатальной жизни и исследовали гистологические срезы каудальной части МАЯ у молодых животных (4 мес.) при отсутствии и осуществлении заместительной терапии. Контрольную группу составляли интактные самцы аналогичного возраста (8 особей). В середине левосторонней части МАЯ на площади 0,01 мм² определяли реактивные изменения клеток и площадь тел малоизмененных нейронов (после окрашивания срезов методом Ниссля), а также число и долю тел нервных клеток, различавшихся по степени экспрессии АР. **Результаты.** Установлено, что нейроны МАЯ содержат большое количество АР, распределенных в различных частях их тела. При гипогонадизме происходит перераспределение АР и снижение степени их экспрессии (количества). Сгущение АР в области оболочки ядра и плазмолеммы, образование конгломератов в ядре и цитоплазме было характерно для нейронов с умеренной экспрессией. В цитоплазме и в области плазматической мембраны рецепторы отсутствовали у клеток со слабой и очень низкой экспрессией. Снижение степени экспрессии АР при гипогонадизме сопряжено с уменьшением площади тела и гибелью части нейронов. **Заключение.** Выявленные дегенеративные тестостерон-зависимые изменения нейронов МАЯ, которые синтезируют ГнРГ или пептиды, влияющие на его выработку, могут обусловить уменьшение высвобождения гонадолиберина, вторичное снижение синтеза андрогенов и реализацию морфофункциональных проявлений его вторичного дефицита. Заместительная терапия частично компенсирует дегенеративные изменения нейронов, восстанавливает интенсивность экспрессии АР, однако не влияет на процесс гибели нервных клеток.

Ключевые слова: медиальное аркуатное ядро; гипогонадизм; рецепторы к андрогенам; нейроны; реактивные изменения.

Для цитирования: Дробленков А.В., Прошина Л.Г., Юхлина Ю.Н., Байрамов А.А., Никитина И.Л., Шабанов П.Д. Тестостерон-зависимые изменения нейронов аркуатного ядра гипоталамуса и их обратимость при моделировании мужского гипогонадизма. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 21—30. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8519

Для корреспонденции: Никитина Ирина Леоровна, доктор мед. наук, зав. каф. детских болезней ФГБУ «Северо-Западный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, e-mail: nikitina0901@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 31.03.2017

Droblenkov A.V.¹, Proshina L.G.², Yuhlina Yu.N.¹, Bairamov A.A.¹, Shabanov P.D.¹, Nikitina I.L.¹

Testosterone-dependent changes in neurons of hypothalamic arcuate nucleus and reversibility of these changes by modeled male hypogonadism

¹ V.A. Almazov North-West Federal Medical Research Center, Akkuratova Str. 2, St. Petersburg 197341, Russia

² Yaroslav-Mudryi Novgorod State University, Bolshaya Sankt-Petersburgskaya Str. 41, Velikiy Novgorod 173003, Russia

Background. Importance of testosterone deficiency for structural homeostasis of the neurons regulating production of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and synthesizing this hormone is insufficiently understood. **Aim.** To determine reactive changes, quantity of androgens receptors (AR), and features of their distribution in neurons of hypothalamic medial arcuate nucleus (MAN) in experimental hypogonadism and reversibility of these changes by restorative therapy with testosterone. **Methods.** Hypogonadism was modeled in 16 Wistar rats by removing one gonad on postnatal days 2-3, and histological sections of caudal MAN were examined in young, 4-month old animals with and without a replacement therapy. The control group consisted of 8 age-matched intact males. Cell reactive changes, areas of slightly changed neuron bodies (Nissl staining of sections), and the number and proportion of nerve cell bodies differing in the degree of AR expression were determined in the middle left-sided part of MAN, on an area of 0.01 mm². **Results.** MAN neurons contained a large quantity of AR distributed in different parts of the neuron body. In hypogonadism, AR redistributed and their expression (quantity) decreased. Condensation of AR in the region of nucleolus and plasmalemma and formation of conglomerates in the nucleus and cytoplasm were characteristic of neurons with moderate expression. In the regions of cytoplasm and plasma membrane, the receptors were absent in cells with low and very low expression. The reduced AR expression in hypogonadism was associated with a decreased neuron body area and death of a part of neurons. **Conclusions.** The identified degenerative changes in the testosterone-dependent neuronal MAN that synthesize GnRH or peptides affecting the GnRH production may decrease the release of GnRH, cause a secondary decrease in the androgen synthesis, and mediate morphological and functional manifestations of GnRH secondary deficit. The replacement therapy partially compensated for degenerative changes in neurons and restored the intensity of AR expression, however, it did not influence the process of nerve cell death.

Keywords: medial arcuate nucleus; hypogonadism; androgen receptors; neurons; reactive changes.

For citation: Droblenkov A.V., Proshina L.G., Yuhlina Yu.N., Bairamov A.A., Shabanov P.D., Nikitina I.L. Testosterone-dependent changes in neurons of hypothalamic arcuate nucleus and reversibility of these changes by modeled male hypogonadism. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 21–30. (in Russ). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8519

For correspondence: Nikitina Irina, Dr. Sci., Professor, Chief of Paediatric Department of North-West Federal Medical Research Center named after Almazov; 2, Akkuratov` street, St. Petersburg, 197341, Russia; e-mail: nikitina0901@gmail.com

Information about authors:

Никитина И.Л. <http://orcid.org/0000-0003-4013-0785>

Дробленков А.В. <http://orcid.org/0000-0001-5155-1484>

Прошина Л.Г. <http://orcid.org/0000-0002-0791-4353>

Байрамов А.А. <http://orcid.org/0000-0002-0673-8722>

Юхлина Ю.Н. <http://orcid.org/0000-0001-9144-0578>

Шабанов П.Д. <http://orcid.org/0000-0003-1464-1127>

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 31.03.2017

Изучение закономерностей половой дифференцировки мозга, особенно выраженной в пубертатном периоде [1], ее гормональной регуляции в условиях нормы и патологии является предметом активного исследовательского интереса [2, 3]. В последние годы стало известно, что выработка гипоталамического гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ), определяющего половую дифференцировку мозга в пубертатном периоде, ее задержка или патологические нарушения в течение жизни опосредована двумя механизмами воздействия на ГнРГ-нейроны. Один из них заключается в пре- и постсинаптических эффектах белков семейства кисспептинов, некоторых других протеинов и глутамата, которые синтезируют нейроны преоптического и медиобазального комплексов гипоталамиче-

ских ядер [4, 5]. Кисспептины, как оказалось, усиливают электрическое возбуждение ГнРГ-нейронов, потенцируют влияние ГАМК на G-белки их мембран [6, 7], тем самым увеличивая экспрессию мРНК и секреторную активность этих клеток [8]. Другой механизм связан с влиянием макроглии, клетки которой вырабатывают факторы роста и малые молекулы, необходимые для поддержания электрического потенциала, высокого уровня пластичности и процессов синтеза в ГнРГ-нейронах [9, 10].

Тела ГнРГ-нейронов в небольшом количестве распределены по всему гипоталамусу [11], содержатся они и в комплексе аркуатных ядер [12], тогда как их аксоны образуют густую сеть в области срединного возвышения [13]. Основным типом нейронов среди

объемного и плотного скопления клеток аркуатных ядер являются ассоциативные (по отношению к ГнРГ-нейронам), синтезирующие кисспептины и другие регуляторы синтеза ГнРГ. Доля последних от общего количества нейронов аркуатных ядер мозга у грызунов составляет не менее 86% [14], причем ассоциативные нейроны аркуатных ядер образуют синапсы на телах и отростках ГнРГ-нейронов самих аркуатных ядер [12].

Эти оба функциональных типа нервных клеток аркуатных ядер, в конечном счете, ответственные за развитие морфофункциональных половых признаков организма, содержат огромное количество рецепторов к андрогенам (АР) [14]. Уменьшение их числа в условиях дефицита тестостерона обуславливает дегенеративные изменения дендритов, снижение постсинаптического потенциала и площади синаптических контактов у пирамидных нейронов гиппокампа, сочетаемые с ослаблением его мнестических функций [15—17], определяет сокращение количества спариваний самцов крыс [18]. Влияние тестостерона на нейроны головного мозга, реализуемые через связывание АР, является системным, поскольку оно обусловлено способностью андрогенов стимулировать синтез и высвобождение медиаторов [19]. В связи с этими данными можно полагать, что уровень тестостерона в крови и число связанных с ним рецепторов в комплексе аркуатных ядер гипоталамуса определяют дифференцировку этой формации мозга, а также дифференцировку половых признаков организма.

Между тем данные о количестве АР в аркуатном комплексе гипоталамических ядер в печати не отражены. Среди целого ряда публикаций, посвященных выявлению АР в различных формациях мозга, попытка дать их количественную оценку была сделана лишь в единичных работах [20]. Подсчет клеток в них был основан на различии ядра нейронов по выраженной и слабой экспрессии АР. Дефицит данных, позволяющих оценить количество нейронов, отличающихся интенсивностью экспрессии АР, может быть обусловлен необходимостью более детальной классификации клеток по интенсивности окрашивания и характеру распределения данных рецепторов не только в ядре, но и в других компонентах клетки. Основанием к этому являются данные о том, что андрогены подвергаются регулируемой диффузии в цитоплазму, в ходе которой образуется комплекс АР с мембранными и цитоплазматическими протеинами [21, 22]. В цитоплазме происходит липофильная активация АР после объединения с андрогенами [23]. Затем активированный комплекс АР переносится в ядро [24, 21], после чего он вступает в связь с андроген-чувствительными участками ДНК [17].

В материалах всех публикаций, касающихся результатов моделирования снижения степени экспрессии АР в структурах мозга, отсутствуют данные о сочетании измененной экспрессии этих рецепторов с другими реактивными изменениями тел нейронов, а также обратимостью изменений последних. Знание реактивных изменений нейронов аркуатных ядер в комплексе с изменениями числа АР при моделировании гипогонадизма и последующего восстановления концентрации сывороточного тестостерона поможет глубже понять степень участия этого гормона в механизме половой дифференцировки мозга.

Цель исследования — установление реактивных изменений количества рецепторов к андрогенам, площади тел нейронов и доли погибших клеток в медиальном аркуатном ядре при экспериментальном гипогонадизме, а также обратимости этих изменений после восстановительной терапии тестостероном.

Методика

Для моделирования мужского гипогонадизма у 16 новорожденных самцов-крыс Вистар в возрасте 2—3 сут. (масса 6—7 г) под кратковременным эфирным наркозом удаляли одну гонаду согласно общепринятой методике [25]. У животных первой экспериментальной группы (8 крыс), таким образом, было индуцировано устойчивое снижение выработки тестостерона (гипогонадизм), что вызывает торможение постнатальной дифференцировки нейронов головного мозга [26]. Животным другой группы (8 крыс) после аналогичной операции в возрасте 4 мес. (половозрелые особи) ежедневно, курсом 10 сут., внутримышечно вводили раствор тестостерона пропионата из расчета 3—5 мг/кг (гипогонадные самцы с лечением). Контролем служили интактные животные (8 крыс). В возрасте 4 мес. и 10 дней всех крыс декапитировали. Эксперимент был осуществлен в весенне-летний период, когда резко возрастает экспрессия рецепторов к тестостерону у клеток различных тканей [27]. 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).

Объектом исследования служила каудальная часть медиального аркуатного ядра (МАЯ) — подотдел аркуатного ядерного комплекса, три составные части которого обладают наибольшими размерами, численной

плотностью нейронов [28] и, следовательно, большим числом синаптических связей с нейронами, вырабатывающими гонадолиберин. Искомую часть МАЯ на уровне bregma -3,6 мм устанавливали при микроскопии пробных неокрашенных парафиновых фронтальных срезов согласно стереотаксическому атласу [29].

Для выявления рецепторов к андрогенам использовали мышинные антитела, клон F3 (Cloud-Clone Corp., Китай) в концентрации 500 мкг/мл. Вторичные биотинилированные антитела применяли из набора VECTASTAIN ABC, США. После проявления связанных антигенов диаминобензидином ядра клеток

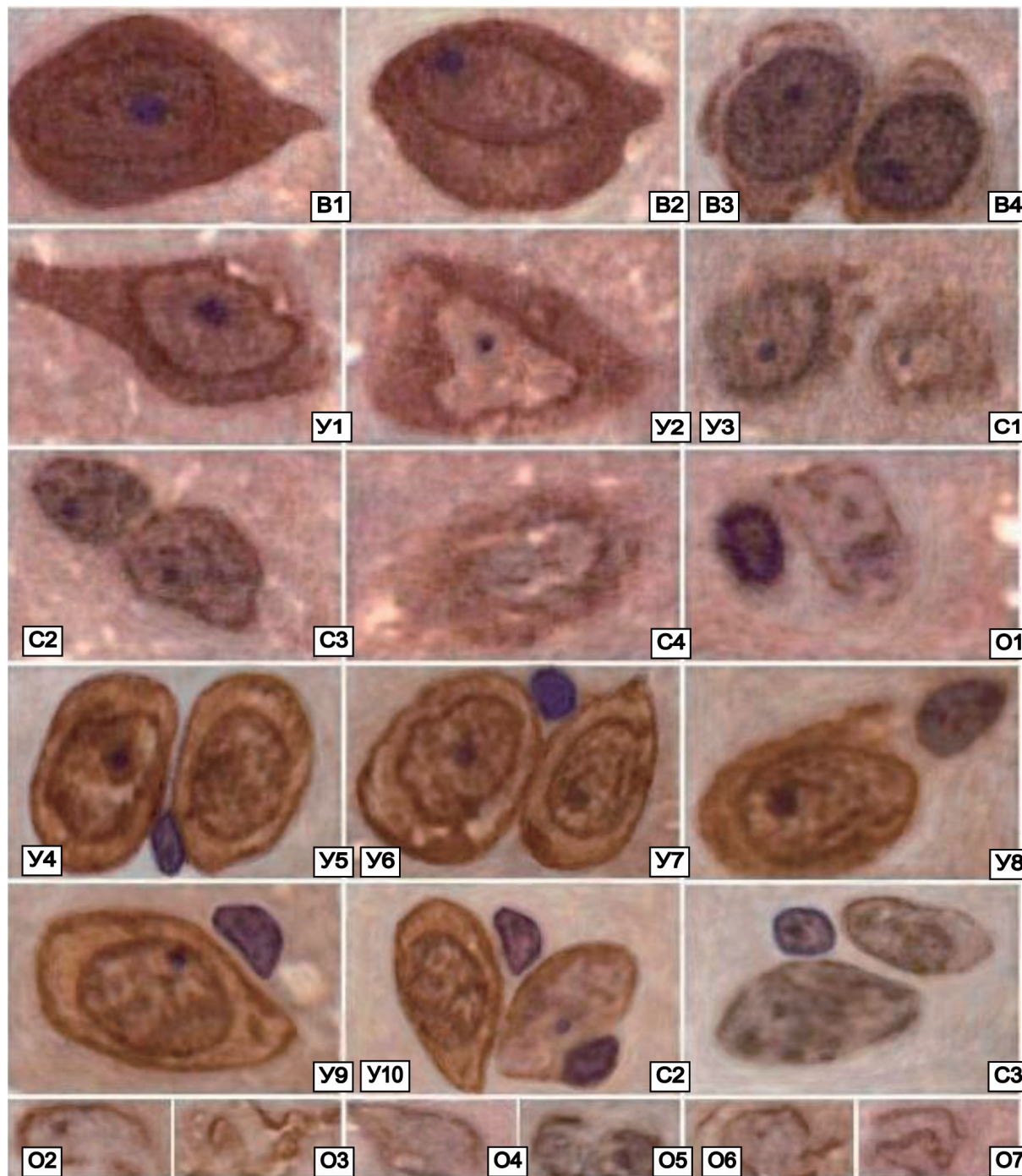


Рис. 1. Классификационные признаки нейронов медиального аркуатного гипоталамического ядра по результатам выявления рецепторов к тестостерону и окрашивания ядер клеток гематоксилином. Ок. x10, об. x100.

докрашивали гематоксилином Карацци. По середине левосторонней части МАЯ в площади $0,01 \text{ мм}^2$ у каждой особи (общее количество подсчетов = 8) определяли: реактивные изменения клеток и площадь тел малоизмененных нейронов (после окрашивания срезов методом Ниссля), а также число и долю тел нервных клеток, различавшихся по степени экспрессии рецепторов к тестостерону.

Различали следующие параметры степени экспрессии: выраженную, умеренную, слабую и очень низкую. Выраженной (В) считали экспрессию рецепторов, при которой внутренняя часть ядра содержала большое число мелкодисперсных частиц АР, расположенных компактно, причем контуры ядерной оболочки окрашивались интенсивно на всем протяжении (рис. 1). Экспрессию рецепторов расценивали как умеренную (У) при их разреженности в наибольшей части площади ядра и (или) цитоплазмы, что в условиях эксперимента обычно сочеталось с концентрацией АР в области ядерной оболочки и плазмолеммы. Слабой (С) экспрессию АР считали при обнаружении частиц в составе тонкой и прерывистой (у части

клеток) области, ассоциированной с оболочкой ядра, наличии отдельных конгломератов АР во внутренней части ядра, а также при разреженности частиц рецепторов или их отсутствии в цитоплазме. Очень низкой (О) считали экспрессию АР при обнаружении скопленных его частиц в области прерывистых и деформированных контуров оболочки ядра.

Окрашенные срезы МАЯ изучали при помощи микроскопа Leica DME (Германия), фотографировали и осуществляли морфометрическое исследование, используя сканер Pannoramic-250 Flash III (Венгрия) и программу 3DHISTECH (Венгрия). Различия средней величины и ее ошибки считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

МАЯ гипоталамуса у взрослых интактных крыс, в сравнении с остальными ядрами аркуатного комплекса было наиболее обширным; размеры тел нейронов и их высокая компактность расположения, визуально, между ядрами этого комплекса не различались (рис. 2, а). Большинство тел нейронов МАЯ облада-

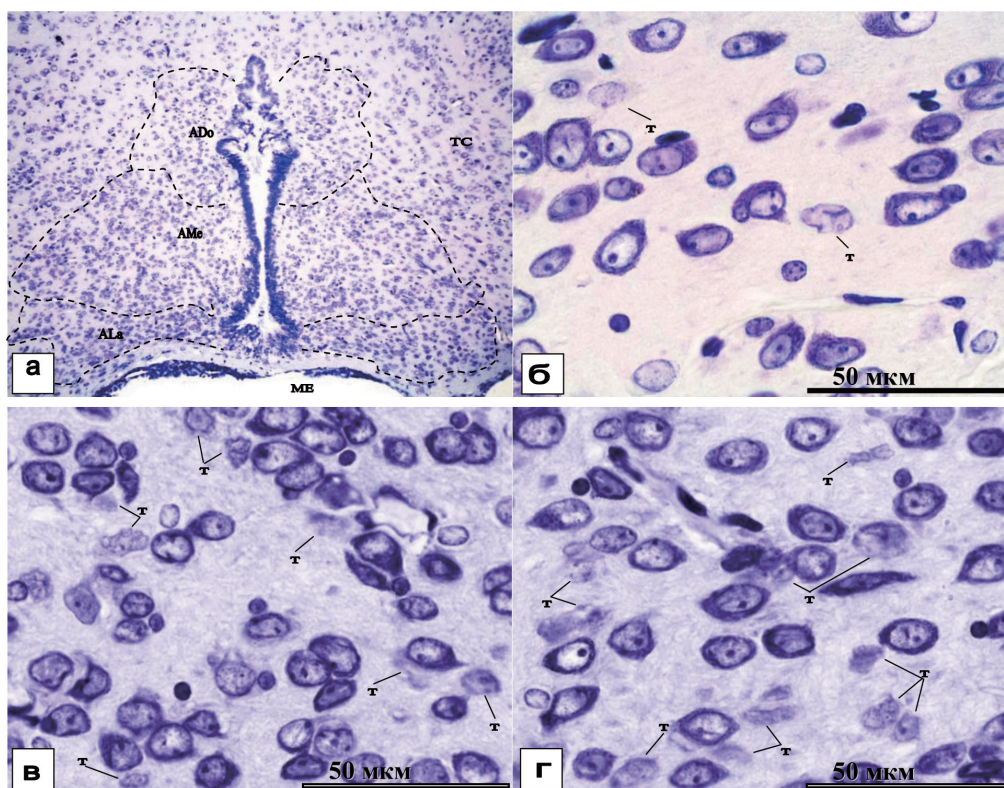


Рис. 2. а – каудальная часть аркуатного ядерного комплекса на уровне bregma -3,6 мм, установленный в результате сопоставления фронтальных срезов промежуточного мозга интактных половозрелых крыс с картами стереотаксического атласа Paxinos G. and Watson C. (1998). Ado – аркуатное дорсальное ядро, Ala – аркуатное латеральное ядро, Ame – аркуатное медиальное ядро, ME – срединное возвышение, TC – область серого бугра, 3v – полость желудочка.

Реактивные изменения нейронов аркуатного медиального ядра у взрослых крыс при моделировании гипогонадизма (в), его терапии тестостероном (г) в сравнении с нормой (б). Т – клетки-«тени». Окраска методом Ниссля, ок. $\times 10$, об. $\times 100$.

ли отчетливыми, ровными, слегка выпуклыми контурами клеточной поверхности, ровной и выпуклой поверхностью оболочки ядра, на некоторых небольших участках содержащей неглубокие инвагинации. Хроматофильная субстанция представляла собой скопления разного количества мелких глыбок, занимавших наибольшую часть цитоплазмы. Данные нейроны были идентифицированы как неизменные (рис. 2, б). Среди нейронов определялись единичные клетки-«тени», представленные сморщенными контурами оболочки ядра или ее фрагментами. Долевое соотношение малоизмененных нейронов и клеток-«теней» в МАЯ интактных крыс представлено в табл. 1.

АР экспрессировали тела всех нейронов МАЯ; ядрышко в телах нейронов, ядрышко, хроматин и ядерная оболочка глиальных клеток, визуальнo, АР не содержали и окрашивались гематоксилином. Уровень экспрессии АР у большинства нейронов был выраженным (В1 — В3, рис. 1).

Внутренняя часть ядра этих клеток содержала большое число мелкодисперсных частиц АР, расположенных компактно, причем контуры ядерной оболочки окрашивались интенсивно на всем протяжении. По плотности распределения АР в частях тел нейронов среди клеток этого типа были выявлены различия. У части клеток контур плазмолеммы окрашивался интенсивно на всем протяжении, метка была рав-

номерно распределена в цитоплазме и ядре (В1). У других клеток этого фенотипа контур плазмолеммы также окрашивался интенсивно на всем протяжении, однако в ядре и цитоплазме определялись участки разреженности метки (В2). У следующей данной разновидности клеток отчетливый контур плазмолеммы выявлялся в части поверхности нейрона (В3), определялось сгущение АР в области оболочки ядра, которая выглядела утолщенной, тогда как в цитоплазме рецепторы образовывали единичные небольшие конгломераты (В4).

В МАЯ интактных крыс присутствовали также многочисленные клетки, содержащие в ядре или цитоплазме наряду с участками компактных скоплений частиц АР участки их выраженной разреженности, причем область их экспрессии, ассоциированная с оболочкой ядра была, визуальнo, широкой. Уровень экспрессии АР у данных клеток был расценен как умеренный. Разреженность частиц АР у некоторых клеток этого типа определялась во внутренней части ядра и участке цитоплазмы (У1), в большей части площади ядра и в небольших участках цитоплазмы (У2), а также в участке ядра и в большей части площади цитоплазмы в сочетании с участком отсутствия выраженной экспрессии АР в области оболочки ядра (У3).

Единичные нейроны отличались слабой (С1—С4) и очень низкой экспрессией АР (О1). Рецепторы

Количество и долевое соотношение субпопуляций нейронов МАЯ на площади 0,01 мм², ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

Таблица 1

Воздействие	Количество и доля нейронов (количество исследованных площадей, m = 8)		Суммарное количество нейронов
	малоизменённых	теневидных	
Нет (контроль)	30,3 ± 1,8 96,0 ± 0,8%	1,3 ± 0,3 4,0 ± 0,8%	100%
Гипогонадизм	32,8 ± 0,7 86,6 ± 1,1%*	5,1 ± 0,5 13,4 ± 1,1%*	100%
Терапия тестостероном	30,0 ± 1,3 82,3 ± 3,8%*	6,0 ± 1,1 17,7 ± 3,8%*	100%

Примечание. * — различия с параметрами клеток в контроле значимы (p<0,05).

Количественные и долевые различия субпопуляций нейронов МАЯ, отличающихся степенью экспрессии рецепторов к тестостерону на площади 0,01 мм², ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

Таблица 2

Воздействие	Степень экспрессии (количество исследованных площадей, m = 8)				Суммарное количество нейронов
	Выражена	Умеренно выражена	Слабо выражена	Очень низкая	
Нет (контроль)	20,0 ± 1,1 62,4 ± 3,3%	9,5 ± 1,4 29,6 ± 4,4%	1,8 ± 0,5 5,3 ± 1,6%	0,9 ± 0,3 2,7 ± 1,6%	100%
Гипогонадизм	0 0%*	9,0 ± 1,3 28,2 ± 3,4%	14,4 ± 1,2 45,8 ± 4,1%*	8,3 ± 1,1 26,0 ± 3,3%*	100%
Терапия тестостероном	2,5 ± 0,8 8,5 ± 3,1%**	16,1 ± 2,0 53,3 ± 5,2%**	7,9 ± 0,9 26,4 ± 2,8%**	3,5 ± 0,8 11,8 ± 2,3%**	100%

Примечание. * — различия с параметрами клеток в контроле значимы (p<0,05); ** — различия с параметрами клеток при гипогонадизме значимы (p<0,05).

у клеток этого типа выявлялись в составе тонкой и прерывистой (у части клеток) области, ассоциированной с оболочкой ядра. В области плазмолеммы АР обычно отсутствовали. Немногочисленные частицы АР и их мелкие конгломераты располагались во внутренней части ядра, тогда как в цитоплазме они отсутствовали (С2, С3). При другом варианте слабой экспрессии основной областью расположения немногочисленных частиц АР и их мелких агрегатов была цитоплазма; рецепторы во внутренней части ядра были единичными или отсутствовали (С1, С4). Очень низкая экспрессия АР определялась в составе фрагментов оболочки ядра клеток-«теней». Количественные и долевые соотношения нейронов, различающихся по степени экспрессии АР, представлены в табл. 2.

В результате моделирования устойчивого снижения выработки тестостерона в неонатальном периоде среди нейронов МАЯ взрослых крыс были выявлены значительные патологические нарушения (рис. 2в). Нейроны, измененные в наименьшей степени (малоизмененные) содержали цитоплазму, визуальнo, меньшего размера (более узкую), чем у интактных крыс. Глыбки хроматофильной субстанции в ней располагались компактно и равномерно, исключая основание главных отростков. Светлое ядро неизменной формы содержало крупное ядрышко, у многих клеток определявшееся вблизи внутренней поверхности кариолеммы. Число тeneвидных нейронов было статистически значимо увеличено. Доля клеток-«теней» возросла в 3,4 раза (табл. 1); соответственно, удельное количество малоизмененных нейронов в МАЯ гипогонадной группы животных существенно сократилось. Площадь тел малоизмененных нейронов уменьшилась в 1,7 раза ($p < 0,05$; рис. 3). Количество клеток сателлитов визуальнo увеличилось: подавляющее большинство тел клеток макроглии (олигодендроцитов и астроцитов) прилежали к поверхности тел нервных клеток.

Признаки выраженной экспрессии АР в структурах нейронов МАЯ гипогонадных крыс отсутствовали. Степень экспрессии у большинства тел малоизмененных нейронов по критериям, приведенным в разделе «методика», соответствовала умеренной. АР у нейронов данного фенотипа концентрировались в области оболочки ядра и цитоплазмы, которые выглядели утолщенными на всем протяжении (У4 — У7 и У9 — У10; рис. 1). Во внутренней части ядра и цитоплазмы АР образовывали конгломераты, различающиеся в разных клетках по количеству и размерам. Значительная часть площади цитоплазмы (наибольшая у части клеток) рецепторов не содержала (У6 — У7 и У9 — У10). У отдельных клеток данного фенотипа частицы и конгломераты АР были распределены в части цитоплазмы; сгущение рецепторов

вблизи плазмолеммы не было выражено (У8). Изменение распределения АР между частями тела нейронов при гипогонадизме не сопровождалось значительным сокращением доли клеток с умеренной степенью экспрессии (табл. 2).

Число и, соответственно, доля нейронов со слабо выраженным уровнем экспрессии АР при гипогонадизме возросла в 8,6 раза ($p < 0,05$). Цитоплазматическая локализация рецепторов у клеток данного фенотипа, в отличие от контроля, была не характерна (С2 — С3). Также значительно возросла и доля нейронов, очень слабо экспрессировавших АР, которые образовывали прерывистые и тонкие скопления в области оболочки ядра. Поскольку многие нейроны этого фенотипа являлись клетками-«теньями», их кариолемма была деформированной, фрагментированной, прерывистой, формировала двойные контуры (О2 — О7).

В результате терапии гипогонадного состояния тестостероном большинство нейронов МАЯ выглядели более крупными, чем в основной экспериментальной группе и содержали многочисленные глыбки хроматофильной субстанции в хорошо выраженной цитоплазме. Частичное восстановление площади тел малоизмененных нейронов у животных этой группы в сравнении с площадью нейронов у гипогонадных крыс (рис. 3), визуальнo было обусловлено увеличением площади цитоплазмы. Среди нейронов определялись также клетки-«тени» (рис. 2, г). Их доля у животных этой группы значительно не различалась с данным параметром у гипогонадных крыс без лечения и многократно превышала удельное количество тeneвидных нейронов у здоровых животных (табл. 1). Число клеток-сателлитов в МАЯ у крыс с терапией гипогонадизма, визуальнo, также оставалось высоким.

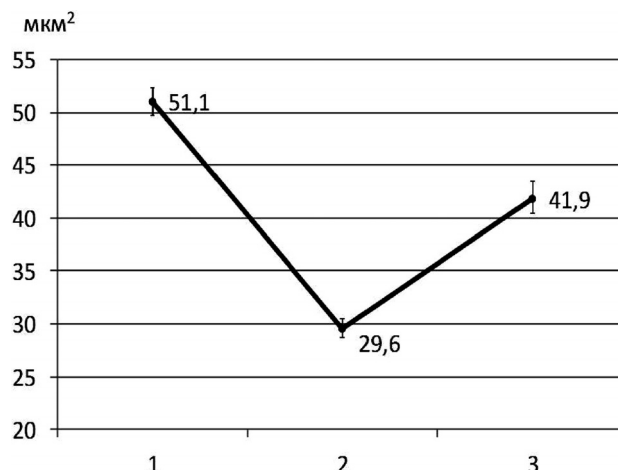


Рис. 3. Изменения площади тел нейронов при гипогонадизме (2) и заместительной терапии (3) в сравнении с параметрами у интактных крыс (1). Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки. Различия между параметрами клеток значимы ($p < 0,05$).

АР в телах некоторых нейронов у крыс гипогонадной группы с лечением были сконцентрированы в большей части площади ядра и цито плазмы, образовывали тонкую непрерывную полосу сгущения в области оболочки ядра. Уровень экспрессии АР нейронов данного фенотипа был выраженным (В2, В3). Большинство нервных клеток характеризовалось умеренной экспрессией АР. В их теле рецепторы имели вид частиц и мелких конгломератов, которые были распределены в небольшой части площади ядра и цитоплазмы (У2, У8). В области оболочки ядра клетки данного фенотипа также формировали тонкую непрерывную полосу сгущения, тогда как концентрация АР в области плазмолеммы не была выражена. У небольшой части нейронов со слабой и очень низкой степенью экспрессии АР в цитоплазме не обнаруживались. Они образовывали небольшие конгломераты во внутренней части ядра, были сконцентрированы в области прерывистой тонкой линии контура кардиолеммы (С2, С3) или в области прерывистых и деформированных контуров оболочки ядра.

Доли нейронов с выраженной и умеренной экспрессией АР в группе гипогонадных крыс с лечением были статистически значимо выше, чем в экспериментальной группе без заместительной терапии, тогда как доля клеток со слабой и очень низкой степенью экспрессии — значимо ниже (табл. 2).

Подводя общие итоги проведенного исследования, считаем важным подчеркнуть следующее. Наличие в медиальном аркуатном ядре интактных крыс, наряду с неизменными нейронами, определенного числа измененных клеток может свидетельствовать о незавершенности процесса программированной гибели нейронов у молодых взрослых крыс. Эти данные согласуются с результатами исследований различных отделов мезокортиколимбической дофаминергической системы и неокортекса здоровых людей и крыс разного возраста [30].

Не вызывает сомнений, что такие выраженные дегенеративные изменения нейронов МАЯ, как уменьшение площади их тел (главным образом, за счет цитоплазмы) в сочетании с гибелью части клеток, происходят вследствие устойчивого дефицита тестостерона. Ключевым фактором в механизме атрофических изменений МАЯ является выявленное снижение экспрессии (сокращение числа) АР нервными клетками данного ядра. В этом убеждают данные, свидетельствующие о грубых морфофункциональных нарушениях нейронов, обусловленных снижением числа их АР, такие, как ослабление синтеза ДНК и рибосомальной РНК [31], электрических потенциалов — пресинаптических [32] и постсинаптических, редукция площади синаптических контактов [15—17]. Выявленные в нашем исследовании дегенеративные изменения

нейронов МАЯ у гипогонадных крыс, которые являются нейросекреторными клетками, вырабатывающими ГнРГ или пептиды, влияющие на его выработку [4, 5, 12, 14], могут обусловить уменьшение выработки и высвобождения гонадолиберина, вторичное снижение синтеза андрогенов и реализацию морфофункциональных проявлений его вторичного дефицита. К последним у растущего организма следует отнести задержку дифференцировки половых признаков, обуславливаемых данным гормоном и системные нарушения, вызванные атрофическими изменениями клеток разной локализации.

В ходе исследования получены новые данные о частичной обратимости как интенсивности экспрессии АР нейронами МАЯ гипоталамуса (которые раньше в данной модели гипогонадизма исследованы не были), так и размеров тел нервных клеток. Данные литературы о причинно-следственной связи между числом АР, концентрацией плазменного тестостерона и уровнем синтеза нуклеиновых кислот [31], а также сведения о восстановлении электрической активности и морфофункциональных признаков синаптической передачи в гиппокампе, полученные при осуществлении заместительной терапии гипогонадизма андрогенами [16, 17, 19], позволяют объяснить и косвенно подтвердить данные о частичной обратимости морфологических нарушений нейронов МАЯ. Вместе с тем, все перечисленные выше аргументы позволяют обосновать гипотезу частичной обратимости тестостерон-зависимых нарушений, таких как дифференцировка половых признаков и системные нарушения, что требует детального подтверждения в ходе дальнейших исследований.

Особым предметом научного интереса, который раскрывается в настоящем исследовании, являются новые данные о локализации и плотности расположения АР в телах нервных клеток, а также о перераспределении рецепторов в модели недостаточности андрогенов. Безусловно, АР, классифицируемые как рецепторы ядерного типа, в конечном счете, локализуясь в интерфазном ядре, связываясь с определенными локусами хромосом, изменяют работу генома [17]. Поэтому в тех редких работах, которые посвящены изучению изменений плотности расположения АР в качестве критерия был использован уровень их экспрессии во внутренней части ядра [20]. Авторами были использованы кроличьи поликлональные антитела к аминокислотам 1-21 АР крыс. Между тем в авторской иллюстрации была хорошо различима и цитоплазматическая локализация АР. Отсутствие в данных этих авторов выраженных локальных сгущений АР и их концентрации в области оболочки ядра и плазмолеммы можно объяснить моделированием более щадящего снижения концентрации андрогена

в их эксперименте — возрастного. Другой вероятной причиной установления участков клеток с нетипичной экспрессией АР является использование в настоящем исследовании моноклональных антител (клон F3, Cloud-Clone Corp., Китай), связывающих как его комплекс с мембранным и цитоплазматическими протеинами, так и его фрагменты, подвергшиеся липофильной деградации в цитоплазме [21, 22]. Поскольку данные об изменениях комплекса АР с цитоплазматическими и мембранными протеинами в условиях дефицита андрогенов в литературе отсутствуют, обоснование выявленной перегруппировки рецепторов между частями нейрона представляется сложным.

Выводы

Нейроны каудальной части МАЯ гипоталамуса содержат огромное количество АР, которые распределены в разных частях их тела: они образуют скопления в ядре, цитоплазме и оболочках клетки. При гипогонадизме происходит как перераспределение АР, так и снижение уровня их экспрессии (количества). АР концентрируются в области оболочки ядра и плазмолеммы нейронов, образуют конгломераты в ядре и цитоплазме; многие клетки утрачивают локализацию рецепторов в цитоплазме и плазмолемме. Снижение степени экспрессии АР при гипогонадизме сопряжено с дегенеративными изменениями и гибелью части нервных клеток. Заместительная терапия тестостероном частично компенсирует дегенеративные изменения нейронов и восстанавливает интенсивность экспрессии АР.

References

- Sumiyoshi A., Nonaka H., Kawashima R. Sexual differentiation of the adolescent rat brain: A longitudinal voxel-based morphometry study. *Neurosci. Lett.* 2017; 642: 168-73. Doi: 10.1016/j.neulet.2016.12.023.
- Nikitina I.L., Bairamov A.A. Formirovanie pola i reproduktivnoy sistemy cheloveka: proshloe, nastoyashee, budushee. *Lechenie i profilaktika.* 2014; (2): 76-85. (in Russian)
- Hoduleva Yu.N., Asaulenko Z.P., Bairamov A.A., Nikitina I.L., Drobenkov A.V. Degenerativnye izmeneniya neuronov medialnogo arkuatnogo gipotalamicheskogo yadra v modeli muzhskogo gipogonadizma. *Pediatrics.* 2015; 6(3): 62-8. (in Russian)
- Ojeda S.R., Terasawa E. Neuroendocrine regulation of puberty. *Hormones, Brain and Behavior.* 2002; 4: 589-659.
- Ojeda S.R., Dubay C., Lomniczi A. et al. Gene Networks and the Neuroendocrine Regulation of Puberty. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010; 324(1): 3-11. Doi: 10.1016/j.mce.2009.12.003.
- Messenger S., Chatzidakis E.E., Ma D. et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102(5): 1761-1766. Doi: .
- Ronnekleiv O.K., Kelly M.J. Kisspeptin Excitation of GnRH Neurons. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013; 784: 113-31. Doi: 10.1007/978-1-4614-6199-9_6.
- Novaira H.J., Ng Y., Wolfe A., Radovick S. Kisspeptin increases GnRH mRNA expression and secretion in GnRH secreting neuronal cell lines. *Molec. Cel. Endocrinol.* 2009; 311: 126-34. Doi: 10.1016/j.mce.2009.06.011.
- Ojeda S.R., Prevot V., Heger S. et al. Glia-to-neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty. *Ann. Med.* 2003; 35(4): 244-55. PMID: 12846266.
- Wilkins A., Majed H., Layfield R. et al. Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 2003; 23(12): 4967-74. PMID: 12832519.
- Conn P.M., Hsueh A.J.W., Crowley W.F.J. Gonadotropin-releasing hormone: Molecular and cell biology, physiology, and clinical applications. *Fed. Proc.* 1984; 43: 2351-61. PMID: 6327393.
- Kallo I., Vida B., Deli L. et al. Co-Localisation of Kisspeptin with Galanin or Neurokinin B in Afferents to Mouse GnRH Neurons. *J. Neuroendocrinol.* 2011; 24: 464-76. Doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02262.x.
- Wray S. Gonadotropin-Releasing Hormone: GnRH-1 System. *Encyclopedia of Neuroscience.* 2009; 4: 967-73.
- Lehman M.N., Merkley C.M., Coolen L.M., Goodman R.L. Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. *Brain Res.* 2010; 1364: 90-102. Doi: 10.1016/j.brainres.2010.09.020.
- Leranth C., Petnehazy O., MacLusky N.J. Gonadal hormones affect spine synaptic density in the CA1 hippocampal subfield of male rats. *J. Neurosci.* 2003; 23(5): 1588-92. PMID: 12629162.
- Moghadami S., Jahanshahi M., Sepehri H., Amini H. Gonadectomy reduces the density of androgen receptor-immunoreactive neurons in male rat's hippocampus: testosterone replacement compensates it. *Behav. Brain Funct.* 2015; 12(1): 5. Published online 2016, Jan., 28. Doi: 10.1186/s12993-016-0089-9.
- Smith M.D., Jones L.S., Wilson M.A. Sex differences in hippocampal slice excitability: role of testosterone. *Neurosci.* 2002; 109(3): 517-30. PMID: 11823063.
- Wu D., Gore A.C. Changes in Androgen Receptor, Estrogen Receptor alpha, and Sexual Behavior with Aging and Testosterone in Male Rats. *Horm. Behav.* 2010; 58(2): 306-16. Doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.03.001.
- Mitsushima D., Takase K., Funabashi T., Kimura F. Gonadal steroids maintain 24 h acetylcholine release in the hippocampus: organizational and activational effects in behaving rats. *J. Neurosci.* 2009; 29(12): 3808-15. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.5301-08.2009.
- Wu D., Lin G., Gore A.C. Age-related Changes in Hypothalamic Androgen Receptor and Estrogen Receptor α in Male Rats. *J. Comp. Neurol.* 2009; 512(5): 688-701. Doi: 10.1002/cne.21925.
- Griffith K., Morton M.S., Nicholson R.I. Androgens, androgen receptors, antiandrogens and the treatment of prostate cancer. *Eur. Urology.* 1997; 32(Suppl. 3): 24-40. PMID: 9267783.
- Roy A.K., Tyagi R.K., Song C.S. et al. Androgen receptor: structural domains and function; dynamics after ligand-receptor interaction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001; 949: 44-57. PMID: 11795379.
- Mora G.R., Tindall D.J. Activation of androgen receptor // Prostate Cancer. Biology, Genetics, and the New

Therapeutics (Eds.: L.W.K. Chung et al.). Totowa (N.J.): Humana Press; 2001: 219-39.

24. Farnsworth W.E. Roles of estrogen and SHBG in prostate physiology. *The Prostate*. 1996; 28: 17-23. Doi: 10.1002/(SICI)1097-0045(199601)28:1.

25. Kirshenblat Ya.D. *Praktikum po endokrinologii*. Moscow; Vysshaya shkola, 1969. (in Russian)

26. Gorski R.A. Hypothalamic imprinting by gonadal steroid hormones. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2002; 511: 57-70. PMID: 12575756.

27. Kerver H.N., Wade J. Relationships among Sex, Season and Testosterone in the Expression of Androgen Receptor mRNA and Protein in the Green Anole Forebrain. *Brain Behav. Evol.* 2014; 84(4): 303-14. Doi: 10.1159/000368388.

28. Tetel M.J., Ungar T.C., Hassan B., Bittman E.L. Photoperiodic regulation of androgen receptor and steroid receptor coactivator-1 in Siberian hamster brain. *Brain Res.* 2004; 131(1-2): 79-87. Doi: 10.1016/j.molbrainres.2004.08.009.

29. Paxinos G., Watson C. *The rat brain atlas in stereotaxic coordinates*. Fourth Edition. — Elsevier Acad. Press, 1998. Copyright, CD-Rom design by Halasz P. — Fig. 32.

30. Drobленков A.V. *Pathological changes of neurons, mesocortical-limbic dopaminergic system in healthy humans and rats. [Morphology. Patologicheskiye izmeneniya neyronov mezokortiko-limbicheskoy dofaminergicheskoy sistemy u zdorovykh lyudey i krys. Morfologiya]*. 2010; 149(3): 11-7. (in Russian)

31. Keil K.P., Abler L.L., Laporta J., Altmann H.M., Yang B., Jarrard D.F., Hernandez L.L., Vezina C.M. Androgen receptor DNA methylation regulates the timing and androgen sensitivity of mouse prostate ductal development. *Dev. Biol.* 2014; 396(2): 237-245. Doi: 10.1016/j.ydbio.2014.10.006.

32. Asuthkar S., Demirkhanyan L., Sun X., Elustondo P.A., Krishnan V. et al. The TRPM8 Protein Is a Testosterone Receptor. *J. Biol. Chem.* 2015; 290(5): 2670-2688. Doi: 10.1074/jbc.M114.610873.

Сведения об авторах:

Дробленков Андрей Всеволодович, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», проф. каф. морфологии человека ГБОУ ВПО «Новгородского университета им. Ярослава Мудрого» Министерства образования и науки РФ, e-mail: droblenkov_a@mail.ru

Прошина Лидия Григорьевна, доктор мед. наук, зав. каф. морфологии человека ГБОУ ВПО «Новгородского университета им. Ярослава Мудрого» Министерства образования и науки РФ, e-mail: lidija.proshina@rambler.ru

Юхлина Юлия Николаевна мл. науч. сотр. НИЛ детской эндокринологии, врач, ассистент кафедры детских болезней ФГБУ «Северо-Западный медицинский исследовательский центр им. В.А.Алмазова» Минздрава РФ, e-mail: dom-j@mail.ru

Байрамов Алекбер Азизович доктор мед. наук, доктор мед. наук, врач ФГБУ «Северо-Западный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, e-mail: alekber@mail.ru

Шабанов Петр Дмитриевич, доктор мед. наук, проф., зав. отделом нейрофармакологии им. С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», вед. науч. сотр. НИЛ детской эндокринологии ФГБУ «Северо-Западный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, e-mail: shabanov@mail.rcm.ru

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092.4

Огородова Л.М.², Рукин К.Ю.³, Петрова И.В.³, Винтизенко С.И.¹

Диагностически значимые факторы-предикторы рестенозирования в стенке у пациентов с ИБС

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт кардиологии» 634012, г. Томск, Россия, ул. Киевская, д. 111, к. А

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050, г. Томск, Россия, ул. Московский тракт, д. 2

³ ООО «Управляющая компания «Единая клиничко-диагностическая лаборатория», 141427, г. Москва, Россия, ул. Рябиновая д. 26 корп. 1, оф. 404-В

В последние годы все больше внимания уделяется интервенционным способам лечения ИБС. Однако, несмотря на многочисленные клинические исследования остается нерешенным вопрос рестенозирования стентов после интервенционных вмешательств. На сегодняшний день становится актуальным изучение молекулярных механизмов рестенозирования коронарных артерий, а также поиск новых генетически обусловленных предикторов развития рестеноза после стентирования. Воздействие NO-синтаз на развитие дисфункции эндотелия не вызывает сомнения, в то же время исследования, посвященные изучению влияния полиморфизма генов NOS на вероятность рестенозирования в стенке единичны и основаны на небольшом количестве клинических наблюдений. Вышесказанное свидетельствует об актуальности данного исследования, результаты которого сформировали новые представления о роли генов NO-синтаз в формировании предрасположенности к гиперпролиферации стентов у больных с ИБС. **Цель** работы — выделение диагностически значимых факторов-предикторов рестеноза после стентирования коронарных артерий у пациентов с ИБС и определение их чувствительности и специфичности при помощи ROC-кривых. **Методика:** в основу данного исследования положены результаты целенаправленного обследования 484 пациентов с верифицированным диагнозом ИБС, находившихся на лечении в отделении атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца ФГБНУ «Научно-исследовательский институт кардиологии» СО РАН. Стентирование коронарных артерий было проведено у 210 чел. — группа рестеноза (n = 60) и группа без рестеноза (n = 150). Исследование генотипа проводили путем выделения геномной ДНК из цельной венозной крови обследуемых по стандартной неэнзиматической методике, а также исследования полиморфизмов генов NOS методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). **Результаты.** Установлено 6 предикторов развития рестенозирования после стентирования при ИБС: протяженность стеноза, сужение коронарной артерии (% стеноза), полиморфизм 894G/T, наличие в анамнезе АГ, наличие у больного гаплотипов TCabGT11 и TTabGG11, определена их чувствительность и специфичность при помощи ROC-кривых. Установлено, что в Сибирской популяции у носителей гаплотипа TCabGT11 наиболее вероятно развитие рестенозирования в стенке, а при наличии гаплотипа TTabGG11 риск рестенозирования минимален. **Заключение.** Полиморфизмы 894 G/T гена eNOS ассоциированы с риском развития рестеноза, что может быть использовано как дополнительные маркеры риска развития рестеноза после стентирования коронарных артерий.

Ключевые слова: заболевания коронарных артерий, стентирование, молекулярные предикторы рестенозирования.

Для цитирования: Огородова Л.М., Рукин К.Ю., Петрова И.В., Винтизенко С.И. Диагностически значимые факторы-предикторы рестенозирования в стенке у пациентов с ИБС. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 31–37. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8520

Для корреспонденции: Рукин Константин Юрьевич, генеральный директор ООО УК «ЕКДЛ», e-mail: eldc-rk@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента № СП — 245.2012.4.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.01.2017

Ogorodova L.M.², Rukin K.Yu.³, Petrova I.V.³, Vintizenko S.I.¹

Diagnostically important predictive factors for in-stent restenosis in patients with ischemic heart disease

¹ Research Institute of Cardiology, Kievskaya Str. 111A, Tomsk 634012, Russia

² Siberian State Medical University, Moskovskiy Trakt 2, Tomsk 634050, Russia

³ Management Company, Unified Clinical Diagnostic Laboratory, Ryabinovaya Str. 26, Moscow 141427, Russia

In recent years, growing attention has been paid to interventional treatment of ischemic heart disease (IHD). However, despite numerous clinical studies, the issue of in-stent restenosis following interventions remains unsolved. At present, studying molecular mechanisms of coronary restenosis along with searching for new, genetically determined predictors of in-stent restenosis has become relevant. Effects of NO synthases on development of endothelial dysfunction are above any doubt; however, studies focusing on the effect of NOS gene polymorphism on probability of in-stent restenosis are scarce and based on a small number of clinical observations. Therefore, the present study is highly relevant as it has resulted in development of new concepts on the role of NO-synthase genes in predisposition to in-stent hyperproliferation in patients with IHD. The **aim** of this study was to identify diagnostically significant, predictive factors for in-stent coronary restenosis in patients with ischemic heart disease and to determine their sensitivity and specificity using ROC curves. **Methods.** This study was based on data from a targeted evaluation of 484 patients with a verified diagnosis of IHD who were managed at the Department of Atherosclerosis and Chronic Ischemic Heart Disease of the Research Institute of Cardiology, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences. Coronary artery stenting was performed for 210 patients divided into two groups, with restenosis ($n = 60$) and without restenosis ($n = 150$). The genotype was studied on isolated genomic DNA from whole venous blood using a standard non-enzymatic technique, as well as by studying NOS gene polymorphisms using the polymerase chain reaction (PCR). **Results.** Six predictors for in-stent restenosis in IHD were identified - stenosis length, per cent narrowing of the coronary artery (% stenosis), 894G/T polymorphism, history of arterial hypertension, presence of TCabGT11 and TTabGG11 haplotypes, and their sensitivity and specificity determined with ROC curves. In the Siberian population, development of in-stent restenosis most likely occurred in carriers of the TCabGT11 haplotype while the risk for restenosis was minimal in the presence of the TTabGG11 haplotype. **Conclusion.** The 894 G/T eNOS gene polymorphisms are associated with a risk for restenosis and might be used as additional markers for the risk of restenosis following coronary stenting.

Keywords: coronary artery disease, stenting, molecular predictors for restenosis.

For citation: Ogorodova L.M., Rukin K.Yu., Petrova I.V., Vintizenko S.I. Diagnostically important predictive factors for in-stent restenosis in patients with ischemic heart disease. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61 (4): 31—37. (in Russian). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8520

For correspondence: Konstantin Y. Rukin, General Director of LLC «UK» EKDL, 26 Ryabinovaya str., Moscow, 141427, e-mail: eldc-rk@yandex.ru

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

Funding. The work was carried out with the financial support of the President's Grant № СП — 245.2012.4.

Information about authors:

Ogorodova L.M., <https://orcid.org/0000-0002-2962-1076>

Rukin K.Y., <http://orcid.org/0000-0002-4894-6909>

Vintizenko S.I., <http://orcid.org/0000-0002-9566-4787>

Petrova I.V., <http://orcid.org/0000-0001-9034-4226>

Received 20.01.2017

Введение

В настоящее время серьезной альтернативой аортокоронарному шунтированию являются эндоваскулярные методы реваскуляризации миокарда, что привело к существенному пересмотру тактики ведения пациентов с ИБС: коронарное стентирование является «золотым стандартом» лечения. В последние годы в России количество процедур имплантации стентов неуклонно увеличивалось и к 2013 году достигло более 20 000 эндоваскулярных операций в год, что, однако, не покрывает всей потребности в данном виде лечения [1]. Однако основным ограничением этого метода является рестенозирование в стенте (РВС), и, несмотря на то, что применение стентов с лекарственными покрытиями уменьшает частоту риска развития осложнений, полностью эта проблема не решена. Рестенозирование коронарных артерий после стентиро-

вания развивается примерно в 20—25% случаев [2]. В связи с этим остается актуальным поиск новых предикторов рестеноза внутри стента для стратификации риска развития данного осложнения.

Методика

В основу данной работы положены результатыце левого обследования 484 пациентов с верифицированным диагнозом ИБС, находившихся на лечении в отделении атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца ФГБНУ «Научно-исследовательский институт кардиологии». Возраст больных в среднем составил 60 (33—83) лет. Среди них 361 (74,9%) мужчина и 121 (25,1%) женщина. От всех больных было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Стентирование коронарных артерий было проведено у 210 чел., из них у 60 (28,3%) впоследствии развился ангиографически верифицированный рестеноз в стенке. Для выявления предикторов рестенозирования все пациенты были разделены на 2 клинические группы.

В I клиническую группу вошли 150 чел., которым была выполнена операция стентирования коронарных артерий, без ангиографических признаков рестенозирования в течение 6—57 мес. после вмешательства. Средний возраст пациентов 59 лет. Количество мужчин составило 84% (126 чел.), женщин — 16% (24 чел.). Артериальную гипертензию в анамнезе имели 26,67% (40 чел.) и 8% (12 чел.) компенсированный сахарный диабет 2 типа. Средний процент сужения артерии, как и в группе с рестенозом составил 83%. Средняя длина пораженного участка — 16,35 мм.

Были установлены следующие критерии включения пациентов в I клиническую группу:

- возраст от 45 до 75 лет;
- ИБС со стабильной формой стенокардии и верифицированным коронарным атеросклерозом;
- стенты голометаллические или с лекарственным покрытием;
- локализация стента преимущественно в проксимальных отделах артерий;
- пролиферация неоинтимы на интактном участке от 0 до 25%;
- отсутствие ангиографических и клинических признаков рестенозирования в стенке через 6—57 мес.

II клиническая группа была сформирована из 60 больных, у которых через 2,5—65 мес. после стентирования были диагностированы ангиографические признаки сосудистого ремоделирования с рестенозом проксимального отдела коронарной артерии более чем на 50%. Средний возраст составил 59 лет. Количество лиц мужского пола составило 77,42% (48 чел.), женщин — 22,58% (14 чел.). Средний процент сужения артерии составил 83%. Средняя длина пораженного участка — 21,20 мм.

Для данной группы определены следующие критерии включения:

- возраст от 45 до 75 лет;
- ИБС со стабильной формой стенокардии и верифицированным коронарным атеросклерозом;
- локализация стента преимущественно в проксимальных отделах артерий;
- пролиферация неоинтимы на интактном участке от 50 до 90%;
- ангиографические и клинические признаки рестенозирования в стенке через 2,5—65 месяцев.

Для предотвращения искажения результатов вследствие воздействия неконтролируемых или не

поддающихся анализу факторов были установлены следующие критерии исключения из исследования:

- острый инфаркт миокарда и постинфарктные осложнения, требующие хирургической коррекции;
- выраженная сердечная недостаточность или отек легких;
- операция аортокоронарного шунтирования в анамнезе;
- сопутствующая патология сердечно-сосудистой системы (клапанные пороки сердца, аневризма аорты и т.п.), являющаяся показанием к хирургическому лечению;
- тяжелые нарушения проводимости и ритма сердца (атриовентрикулярная блокада II—III степени, частые полиморфные желудочковые экстрасистолы, пароксизмы желудочковой тахикардии, мерцательная аритмия, имплантированный искусственный водитель сердечного ритма);
- семейные формы гиперхолестеринемии и гипертриглицеридемии;
- сахарный диабет (СД) I типа или декомпенсированный СД II типа;
- онкологические заболевания;
- печеночная и (или) почечная недостаточность;
- злоупотребление алкоголем и никотином;
- прием антиоксидантных препаратов;
- отказ больного от исследования.

Поиск потенциальных предикторов рестенозирования проводился с помощью логистической регрессии. Логистическая регрессия (логит-регрессия) является наиболее часто используемым в медицине методом предсказания вероятности некоторого события на данных множества признаков. Классической записью любого уравнения логит-регрессии является запись вида:

$$y = e^{\text{logit}} / (1 + e^{\text{logit}}),$$

где «e» — экспонента, основание натурального логарифма, «y» — зависимый показатель, вероятность которого необходимо предсказать. «Logit» представляет собой линейное уравнение вида $\text{logit} = a + bx$, где a — свободный член уравнения, x — значение показателя-предиктора, b — коэффициент показателя-предиктора.

Результат решения этого линейного уравнения является числом, в степень которого возводится экспонента в уравнении логит-регрессии. Вариантом записи уравнения является запись вида:

$$y = \exp(\text{logit}) / (1 + \exp(\text{logit})),$$

при этом экспонента обозначается как «exp», а «exp(logit)» означает возведение экспоненты в степень logit.

Результатом решения уравнения является вероятность прогнозируемого события; она изменяется в до-

лях единицы (независимо от единиц измерения предиктора) и может быть переведена в проценты.

Для анализа с помощью логистической регрессии в выборку был введен показатель исхода. Он определял вероятность развития рестенозирования как осложнения стентирования и кодировался как «0» при отсутствии развития рестенозирования, «1» при наличии рестенозирования.

Чувствительность и специфичность выявленных показателей-предикторов оценивалась с помощью ROC-кривых (New York, NY: John Wiley and Sons Inc., 1966). Также с их помощью определялись точки отсечения показателя исхода, при которых чувствительность и специфичность модели будут оптимальными. Чувствительностью (sensitivity, Se) называют долю истинно положительных случаев, специфичностью (specificity, Spe) — долю истинно отрицательных. Таким образом, показатель с высокой чувствительностью будет чаще давать истинные результаты при наличии неблагоприятного исхода (развитии рестенозирования), а показатель с высокой специфичностью — при наличии благоприятного исхода (отсутствии рестенозирования). Специфичность можно также определить как способность показателя четко разделять пациентов с благоприятными и неблагоприятными исходами. Точка отсечения вероятности определяет разбиение выборки на два класса — с благо-

приятными и неблагоприятными исходами: если полученная при решении уравнения вероятность больше точки отсечения — прогноз неблагоприятный, если меньше — благоприятный.

Предикторы сравнивались между собой по прогностической способности с помощью площади под ROC-кривой (AUC — area under curve): чем больше площадь, тем выше прогностическая способность модели.

Результаты и обсуждение

Поиск предикторов в ходе исследования проводился на всех признаках, которые, по данным последних исследований, могут способствовать рестенозированию. При анализе было найдено 6 предикторов, имеющих прогностическую ценность в развитии рестенозирования после стентирования при ОИМ: протяженность стеноза, сужение коронарной артерии (% стеноза), полиморфизм 894G/T, наличие в анамнезе АГ, наличие у больного гаплотипов TCabGT11 и TTabGG11, которые в дальнейшем прошли через анализ при помощи ROC-кривых. Диагностическая эффективность (предсказательная способность) каждого предиктора оценивалась по общепринятой экспертной шкале для значений площади под характеристической ROC-кривой AUC.

Полученные результаты отражены на рис. 1—6.

Уравнение логит-регрессии для первой модели (протяженность стеноза) имело вид:

$$\text{Исход} = \exp(-2,27+0,07*\text{протяженность стеноза}) / (1+\exp(-2,27+0,07*\text{протяженность стеноза})),$$

где «Исход» — вероятность рестенозирования в долях единицы (здесь и далее — %), протяженность стеноза выражена в ед. изм.

Как видно из логистической кривой на рис. 1,а, увеличение значения показателя «протяженность стеноза» увеличивает вероятность неблагоприятного исхода и, наоборот, уменьшение значения показателя «протяженность стеноза» уменьшает вероятность неблагоприятного исхода. Чувствительность показателя составила 30,77%, специфичность — 94,52%, площадь под ROC-кривой — 60,4% (рис. 1,б).

Уравнение регрессии для второй модели — % стеноза (сужения коронарной артерии) имело вид:

$$\text{Исход} = \exp(2,24-0,04*\text{процент стеноза}) / (1 + \exp(2,24-0,04*\text{процент стеноза})),$$

где «процент стеноза» выражен в %.

Как видно из рис. 2,а, увеличение значения показателя «процент стеноза» уменьшает вероятность рестенозирования, и, наоборот, уменьшение процента стеноза увеличивает вероятность рестенозирования. Чувствительность показателя 84,62%, специфичность — 37,5%, площадь под ROC-кривой — 61,1% (рис. 2,б).

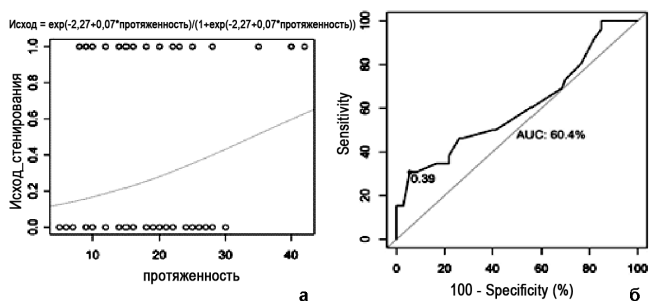


Рис. 1. Зависимость исхода от значения показателя «протяженность стеноза» (а) и ROC-кривая чувствительности (Se) и специфичности (Spe) для показателя протяженности стеноза (б).

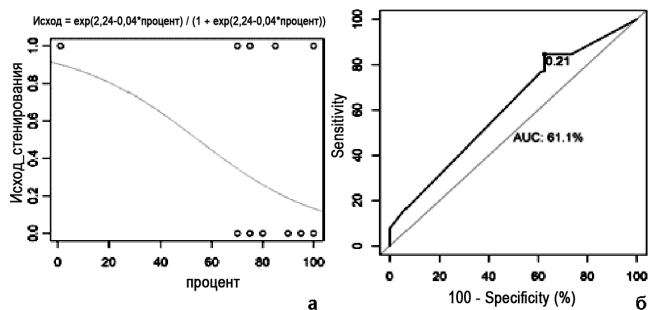


Рис. 2. Зависимость исхода от значения показателя «процент стеноза» (а) и ROC-кривая чувствительности (Se) и специфичности (Spe) для показателя «процент стеноза» (б).

Уравнение регрессии для третьего предиктора — полиморфизма 894G/T имело вид:

$$\text{Исход} = \exp(-1,71+0,64*894G/T) / (1 + \exp(-1,71+0,64*894G/T)),$$

где показатель полиморфизма «894G/T» являлся номинальным признаком и был кодирован как «0» для значения «GG», «1» для значения «TT», «2» для значения «GT».

Как видно из логистической кривой на рис. 3,а, наличие у пациента полиморфизма 894 G/T увеличивает вероятность неблагоприятного исхода стентирования, и, наоборот, отсутствие полиморфизма 894 G/T уменьшает вероятность неблагоприятного исхода. Чувствительность (Se) модели была равна 76,92%, специфичность (Spe) — 54,67%, площадь под ROC-кривой — 65,3% (рис. 3,б).

Уравнение регрессии для четвертой модели — с показателем артериальной гипертензии имело следующий вид:

$$\text{Исход} = \exp(-1,61+1,56*AG) / (1 + \exp(-1,61+1,56*AG)),$$

где «AG» — бинарный показатель наличия артериальной гипертензии, принимавший значение «1» при ее наличии, «0» — при отсутствии.

По логистической кривой на рис. 4,а видно, что наличие артериальной гипертензии увеличивает вероятность неблагоприятного исхода после стентирования, и, наоборот, отсутствие артериальной гипертензии уменьшает вероятность неблагоприятного исхода. Чувствительность (Se) модели составила 62,07%, специфичность (Spe) — 74,32%, площадь под ROC-кривой — 68,02% (рис. 4,б).

Уравнение логит-регрессии для пятой модели — с участием показателя гаплотип «TCabGT11» имело следующий вид:

$$\text{Исход} = \exp(-1,17+2,96*TCabGT11) / (1 + \exp(-1,17+2,96*TCabGT11)),$$

где показателем «TCabGT11» принимал значение «1» при наличии гаплотипа, «0» — при отсутствии гаплотипа.

Как видно из рис. 5,а, увеличение значения показателя гаплотип «TCabGT11» увеличивает вероятность рестенозирования и, наоборот, уменьшение значения показателя гаплотип «TCabGT11» уменьшает вероятность рестенозирования. Чувствительность показателя составила 20,69%, специфичность — 98,67%, площадь под ROC-кривой — 59,7% (рис. 5,б).

Уравнение логит-регрессии для модели с участием показателя гаплотип «TTabGG11» имело следующий вид:

$$\text{Исход} = \exp(-0,81-16,76*TTabGG11) / (1 + \exp(-0,81-16,76*TTabGG11)),$$

где «TTabGG11» принимал значение «1» при наличии гаплотипа, «0» — при его отсутствии.

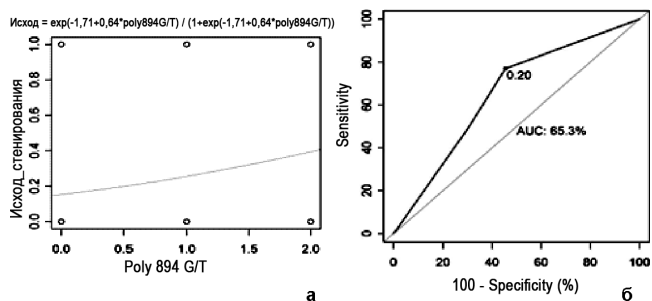


Рис. 3. Зависимость исхода от значения показателя «полиморфизм 894 G/T» (а) и ROC-кривая чувствительности (Se) и специфичности (Spe) для показателя «полиморфизм 894 G/T» (б).

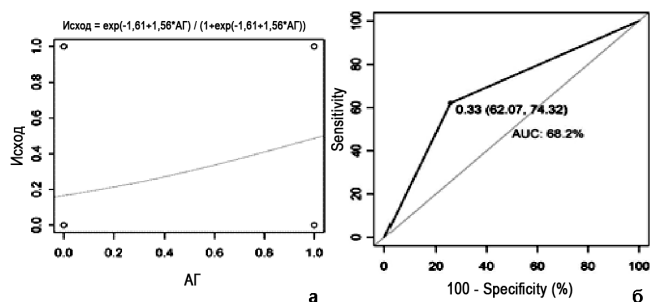


Рис. 4. Зависимость исхода от значения показателя «артериальная гипертензия» (а) и ROC-кривая чувствительности (Se) и специфичности (Spe) для показателя «артериальная гипертензия» (б).

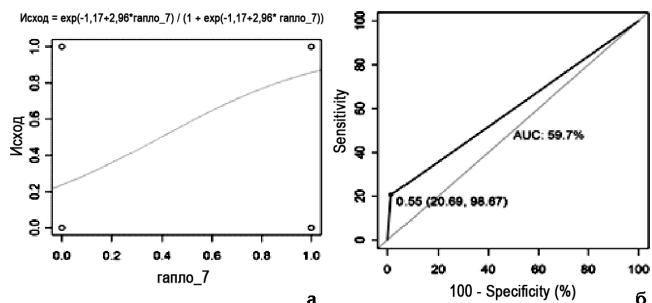


Рис. 5. Зависимость исхода от значения показателя гаплотип «TCabGT11» (а) и ROC-кривая чувствительности (Se) и специфичности (Spe) для показателя гаплотип «TCabGT11» (б).

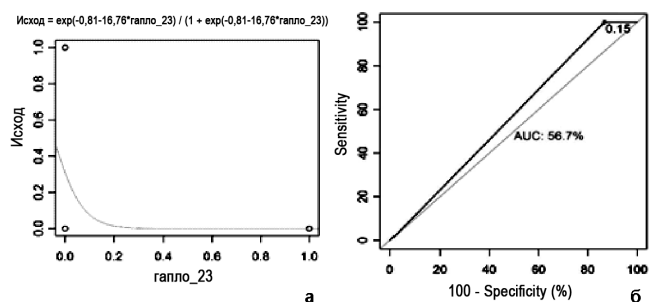


Рис. 6. Зависимость исхода от значения показателя «TTabGG11» (а) и ROC-кривая чувствительности (Se) и специфичности (Spe) для показателя «TTabGG11» (б).

По графику логистической кривой на рис. 6,а видно, что увеличение значения показателя «TTabGG11» уменьшает вероятность рестенозирования после стентирования коронарной артерии, и, наоборот, уменьшение значения показателя «TTabGG11» увеличивает вероятность рестенозирования. Чувствительность (Se) модели была равна 100%, специфичность (Spe) — 13,33%, площадь под ROC-кривой — 56,70% (рис. 6,б).

Таким образом, интерпретируя результаты проведенного анализа с помощью логистической регрессии и ROC-анализа (таблица), следует отметить, что наименьшей прогностической точностью обладали показатели-предикторы гаплотипов TCabGT11 и TTabGG11 (AUC 59,7% и 56,7% соответственно). Более высокие показатели отмечались для переменных: «протяженность стеноза» (AUC = 60,4%); «сужение артерии (% стеноза)» (AUC = 61,1%). Самые высокие значения площади под кривой выявлены для переменных «полиморфизм 894 G/T» и «артериальная гипертензия» (AUC 65,3% и 68,2% соответственно).

Широкое применение коронарного стентирования и анализ большого количества исследований позволили выделить факторы риска возникновения РВС [3]. Один из наиболее значимых факторов риска — наличие у пациента сахарного диабета, что ассоциировано с 5-кратным увеличением риска развития РВС [4]. Установлен ряд морфологических предикторов развития РВС — длина стеноза более 20 мм, устьевые поражения, бифуркационное и множественное стентирование, стентирование венозных шунтов, проксимальной трети передней нисходящей артерии и артерий малого диаметра (менее 3 мм), хроническая окклюзия [2, 3, 5]. Предикторами развития РВС также являются малый диаметр (менее 3 мм) сосуда после стентирования и неоптимальное расположение стента [2, 6].

В настоящее время во всём мире интенсивно проводятся исследования, посвящённые изучению связи полиморфизмов кандидатных генов с риском развития РВС. Исследуются полиморфизмы генов ангиотензин-альдостероновой системы [7, 8], провоспалительных цитокинов и медиаторов воспаления [9, 10], системы гемостаза [9], регуляторных белков клеточного цикла и регуляторов пролиферации [10, 11]. Полученные нами результаты дополняют спектр выделенных генетических предикторов РВС, что, позволяет прогнозировать риск рестенозирования и тем самым уменьшать вероятность неблагоприятного исхода после стентирования. Следует отметить, что результаты исследований в области генетических основ развития РВС характеризуются неоднозначностью и противоречивостью полученных в них результатов. Это, вероятно, связано, с этническими особенностями, методологическими проблемами, а также неоднородностью обследуемых групп в отношении наличия других факторов риска РВС.

Заключение

Нами впервые установлено, что в Сибирской популяции предикторами развития рестенозирования являются: полиморфизм 894 G/T, артериальная гипертензия, протяженность стеноза и наличие гаплотипа TCabGT11. В этом случае пациентам необходимо обращать особое внимание на компенсацию и лечение ИБС и СД. При наличии гаплотипа TTabGG11 у пациента наиболее вероятен благоприятный исход и риск рестенозирования минимален. Полученные данные свидетельствуют о высокой прогностической и практической ценности генетических исследований.

Также в исследовании установлено, что процент сужения коронарной артерии (% стеноза) в нашем исследовании не является предиктором развития рестенозирования в стенке.

Таблица

Прогностические характеристики предикторов развития рестенозирования после стентирования коронарных артерий

Показатель	Чувствительность, %	Специфичность, %	Точка отсечения вероятности	AUC, %	Уровень значимости p для модели
Протяженность стеноза	30,77	94,52	>0,39	60,4	0,022
Сужение артерии (%)	84,62	37,5	>0,21	61,1	0,009
Полиморфизм 894G/T	76,92	54,67	>0,20	65,3	0,013
Артериальная гипертензия	62,07	74,32	>0,33	68,20	0,001
TCabGT11	20,69	98,67	>0,55	59,7	0,001
TTabGG11	100	13,33	>0,15	56,7	0,008

References

1. Savchenko A.P. *Interventional cardiology: coronary angiography and stenting*. [Rukovodstvo]. Moscow: GEOTAR; 2010. (in Russian)
2. Kim M.S., Dean L.S. In-Stent Restenosis. *Cardiovasc Ther*. 2011; 29(3): 190-8.
3. Kastrati A., Schomig A., Elezi S. et al. Predictive factors of restenosis after coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol*. 1997; 30: 1428-36.
4. Ryden L., Grant P.J., Anker S.D., Berne C., Cosentino F., Danchin N. et al. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J*. 2013; 34(39): 3035-87.
5. Stone G.W., Ellis S.G., Cox D.A. et al. TAXUS-IV investigators. One-year clinical results with slow-release, polymer-based, paclitaxel-eluting TAXUS stent: the TAXUS-IV trial. *Circulation*. 2004; 109: 1942-7.
6. Gerald S. Collaterals: how important are they? *Heart*. 2007; 93(7): 778-9.
7. Agema W.R. et al. Current PTCA practice and clinical outcomes in The Netherlands: The real world in the pre-drug-eluting stent era. *Eur Heart J*. 2004; 25(13): 1163-70.
8. Wijpkema J.S., Van Haelst P.L., Monraats P.S., Bruinenberg M. et al. Restenosis after percutaneous coronary intervention is associated with the angiotensin-II type-1 receptor 1166A/C polymorphism but not with polymorphisms of angiotensin-converting enzyme, angiotensin-II receptor, angiotensinogen or heme oxygenase-1. *Pharmacogenet Genomics*, 2006; 16(5): 331-7.
9. Kastrati A., Koch W., Gawaz M. et al. PIA polymorphism of glycoprotein IIIa and risk of adverse events after coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol*, 2000; 36: 84-9.
10. Monraats P.S., Kurreeman F.A., Pons D., Sewgobind V.D., de Vries F.R., Zwinderman A.H. et al. Interleukin 10: a new risk marker for the development of restenosis after percutaneous coronary intervention. *Genes Immun*. 2007; 8(1): 44-50.
11. Tiroch K., Koch W., Mehilli J., Bottiger C., Schomig A., Kastrati A. P27 and P53 gene polymorphisms and restenosis following coronary implantation of drug-eluting stents. *Cardiology*. 2009; 112(4): 263-9.

Сведения об авторах

Огородова Людмила Михайловна, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, Сибирский государственный медицинский университет, Томск. E-mail: lm-ogorodova@mail.ru;

Рукин Константин Юрьевич, генеральный директор ООО «Единая клинико-диагностическая лаборатория», e-mail: eldc-rk@yandex.ru;

Петрова Ирина Валерьевна, директор медицинского департамента ООО «Единая клинико-диагностическая лаборатория» e-mail: irinavall@mail.ru;

Винтизенко Станислав Игоревич, канд. мед. наук, ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАН, e-mail: stasv@bk.ru

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.14-089

Восканян С.Э., Шабалин М.В., Колышев И.Ю., Найденев Е.В.

Оценка проходимости синтетических кондуитов из пористого политетрафторэтилена при реконструкции магистральных вен (экспериментальное исследование)

ФГБУ ГНЦ «Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России, 123098, г. Москва, Россия, ул. Маршала Новикова, д. 23

Цель — изучение проходимости синтетических кондуитов из пористого политетрафторэтилена при реконструкции магистральных вен и обоснование их применения в клинической практике. **Методика.** Исследование выполнено на 70 кроликах половозрелого возраста мужского пола породы «Белый новозеландский» массой 3,0—3,5 кг. 40 кроликам выполнено линейное протезирование инфраренального отдела задней полой вены. 30 кроликам выполнено линейное протезирование инфраренального отдела брюшной аорты (группа сравнения). Оперативные вмешательства были выполнены в асептических условиях под внутримышечным наркозом. Для протезирования брюшной аорты и задней полой вены использовали политетрафторэтиленовые протезы (7 поколение, 2010) производства ЗАО «НПК «Экофлон» (Россия) с внутренним диаметром 4,0 мм и длиной 20,0 мм. Все анастомозы формировали атравматическим шовным материалом 7/0 или 8/0 с использованием микроинструментов. На протяжении всего срока эксперимента антикоагулянтной и антиагрегантной терапии не проводилось. В течение всего срока наблюдения контроль проходимости протезов осуществляли ультразвуковой доплерографией скоростных показателей кровотока дистальнее и проксимальнее протеза на сроках 3, 10, 30, 90, 180, 270 сут. На контрольных сроках наблюдения проходимость протеза оценивали прямым инвазивным измерением давления крови, а также интраоперационной ультразвуковой доплерографией линейной скорости кровотока дистальнее и проксимальнее протеза. После вывода животного из эксперимента протез иссекали с окружающими тканями для дальнейшего изучения. При сравнении показателей давления крови и линейной скорости кровотока дистальнее и проксимальнее протеза на разных сроках использовали критерий Манна—Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался $\leq 0,05$. **Результаты.** Статистически значимой разницы линейных скоростей кровотоков и давления крови проксимальнее и дистальнее протеза на всех сроках наблюдения не выявлено. Проходимость протезов из политетрафторэтилена в венозной позиции не отличается от таковой в артериальной позиции. Тромбозов и гемодинамически значимых стенозов синтетических кондуитов из пористого политетрафторэтилена, как в венозной, так и в артериальной позиции не отмечено на всех сроках. **Заключение.** Проходимость синтетических кондуитов из пористого политетрафторэтилена в венозной позиции сравнима и не отличается от таковой в артериальной позиции. Полученные данные позволяют получить экспериментальное обоснование возможности использования синтетических кондуитов из пористого политетрафторэтилена при реконструкции магистральных вен в клинической практике.

Ключевые слова: реконструкция вен; пористый политетрафторэтилен; проходимость протезов.

Для цитирования: Восканян С.Э., Шабалин М.В., Колышев И.Ю., Найденев Е.В. Оценка проходимости синтетических кондуитов из пористого политетрафторэтилена при реконструкции магистральных вен (экспериментальное исследование). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 38—43.
DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8521

Для корреспонденции: Шабалин Максим Вячеславович, врач-хирург центра хирургии и трансплантологии ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, e-mail: shabalin.max.v@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.04.2017

Voskanyan S.E., Shabalin M.V., Kolyshev I.Ju., Naydenov E.V.

Evaluating the patency of PTFE grafts in reconstruction of great veins (experimental study)

A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA, 123098 Moscow, Marshala Novikova str., 23

Aim. To study patency of synthetic, porous polytetrafluoroethylene (PTFE) conduits in reconstruction of great veins and to justify their use in clinical practice. **Methods.** The study was conducted on 70 New Zealand male rabbits weighing 3.0-3.5 kg.

Infrarenal linear prosthetic reconstruction of posterior vena cava was performed in 40 rabbits. Infrarenal linear prosthetic reconstruction of abdominal aorta was performed in 30 rabbits (control group). All surgical procedures were conducted in aseptic conditions under intramuscular anesthesia. Porous PTFE conduits with 4 mm internal diameter and 20 mm length (7th generation, 2010; ZAO NPK Ecoflon, Russia) were used for prostheses of aorta and posterior vena cava. All anastomoses were made of atraumatic 7/0-8/0 ligature using microsurgical instruments. No anticoagulant therapy was used throughout the experimental period. During the study, conduit patency was controlled by ultrasound Doppler monitoring of blood flow velocity distal and proximal to the conduit and direct, invasive BP measurements during the surgery and at 3, 10, 30, 90, 180, and 270 days of surgery. At the end of experiment, the conduit was removed from the animal together with adjacent structures. The Mann-Whitney U-test was used for comparison of BP and blood flow velocity distal and proximal to the conduit. Differences were considered significant at $p < 0.05$. **Results.** Significant differences between values of linear blood flow velocity and BP distal and proximal to the conduit were absent in the entire follow up period. The patency of porous PTFE conduits was similar in both arterial and venous positions. No conduit thrombosis or hemodynamically significant stenosis were observed in arterial or venous positions in the entire follow up period. **Conclusion.** The patency of PTFE conduits in the venous position is similar to and not different from the arterial position. The obtained experimental data support the use of synthetic PTFE conduits for reconstruction of great veins in clinical practice.

Conclusion. The polytetrafluoroethylene conduits patency of in venous position is similar and does not differ from arterial position. Obtained experimental data gives the opportunity for synthetic polytetrafluoroethylene conduits appliance for main vein reconstruction in clinical practice.

Keywords: venous reconstruction, porous polytetrafluoroethylene, patency of prostheses.

For citation: Voskanyan S.E., Shabalin M.V., Kolyshev I.Ju., Naydenov E.V. Evaluating the patency of PTFE grafts in reconstruction of great veins (experimental study). *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61 (4): 38—43. (in Russian). DOI:1 0.25557/IGPP.2017.4.8521

For correspondence: Maxim V. Shabalin, Surgery and Transplantology Center Surgeon of Federal Medical and Biological Center of Federal Medical and Biological Agency of Russia; 23 Marshala Novikova Str., Moscow 123098, Russian Federation, e-mail:

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Voskanyan S.E., <http://orcid.org/0000-0001-5691-5398>

Shabalin M.V., <http://orcid.org/0000-0002-4527-0448>

Kolyshev I.Ju., <http://orcid.org/0000-0002-6254-130X>

Naydenov E.V., <http://orcid.org/0000-0002-9753-4345>

Received: 05.04.2017

Введение

В настоящее время заболеваемость злокачественными новообразованиями с инвазией магистральных вен не имеет тенденции к снижению, а результаты их лечения нельзя назвать удовлетворительными [1, 2]. Поражение магистральных вен: воротной и верхней брыжеечной вены, нижней полой вены, подвздошных вен при опухолевых заболеваниях длительное время считалось противопоказанием к оперативному лечению. Последние исследования и накопленный опыт показывают возможность и необходимость проведения оперативных вмешательств с резекцией магистральных вен с одномоментной их реконструкцией [3—5]. Для аутовенозного способа реконструкции используют кондуиты из поверхностной бедренной вены, левой почечной вены, внутренней яремной вены и др. [6—8] Среди синтетических кондуитов выделяют протезы из пористого политетрафторэтилена, полиуретана, полиэфирного волокна — дакрона.

Также все более широкое применение находят биологические кондуиты, например из криообработанных гомологичных сосудов [9]. Вопрос о выборе пластического материала для реконструкции вен на данный момент дискуссионен. Протезы из пористого политетрафторэтилена длительное время успешно используются при реконструкции артерий. Их проходимость в артериальной позиции хорошо изучена [10]. Однако описанных клинических случаев и небольшого числа крупных рандомизированных исследований длительного наблюдения проходимости протезов из пористого политетрафторэтилена при реконструкции магистральных вен недостаточно для того, чтобы убедительно высказаться за или против их повсеместного использования в клинической практике.

Цель — изучение проходимости протезов из пористого политетрафторэтилена при реконструкции магистральных вен и артерий со сроком наблюдения до 270 сут.

Методика

Исследование выполнено на 70 половозрелых кроликах мужского пола породы «Белыйновозеландский» массой 3,0—3,5 кг. 40 кроликам выполнено линейное протезирование инфраренального отдела задней полой вены. 30 кроликам выполнено линейное протезирование инфраренального отдела брюшной аорты (группа сравнения). Оперативные вмешательства были выполнены в асептических условиях под внутримышечным наркозом. Для протезирования брюшной аорты и задней полой вены использовали политетрафторэтиленовые протезы (7 поколение, 2010) производства ЗАО «НПК «Экофлон» (Рос-

сия) с внутренним диаметром 4,0 мм и длиной 20,0 мм. Все анастомозы формировали атравматическим шовным материалом 7/0 или 8/0 с использованием микроинструментов. На протяжении всего срока эксперимента антикоагулянтной и антиагрегантной терапии не проводилось. В течение всего срока наблюдения контроль проходимости протезов осуществляли ультразвуковой доплерографией скоростных показателей кровотока дистальнее и проксимальнее протеза на сроках 3, 10, 30, 90, 180, 270 сут. Исследование проводили с помощью портативного ультразвукового аппарата «SonoSite M-Turbo» (США) с линейным датчиком 13—6 МГц. По истечении срока наблюдения животным под внутримышечным наркозом выполняли релапаротомию. Проходимость протеза оценивали прямым инвазивным измерением давления крови с помощью реаниматологического монитора «SIEMENS SC 9000» (Германия), а также интраоперационной ультразвуковой доплерографией линейной скорости кровотока дистальнее и проксимальнее протеза. После вывода животного из эксперимента протез иссекали с окружающими тканями для дальнейшего изучения. Исследование было одобрено этическим комитетом и выполнено в соответствии со стандартами Хельсинкской декларации 1975 г. и её пересмотра в 2008 г.

Статистическая обработка результатов исследования проведена при помощи программы Statistica 6.0. При сравнении показателей давления крови и линейной скорости кровотока дистальнее и проксимальнее протеза на разных сроках использовали критерий Манна—Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался $\leq 0,05$.

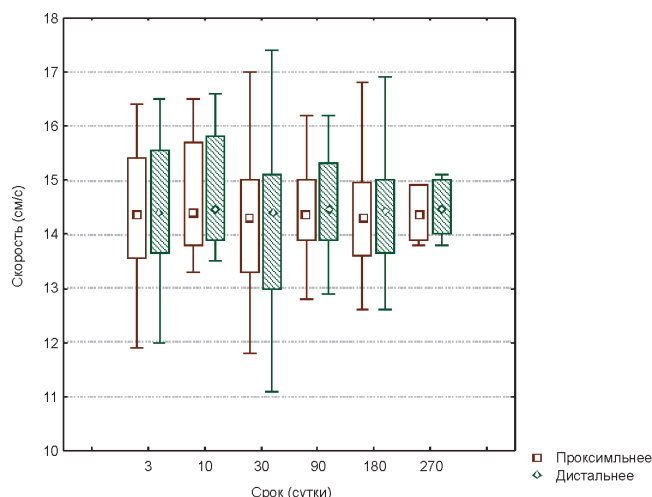


Рис. 1. Линейная скорость кровотока в задней полой вене дистальнее и проксимальнее протеза на ранних и поздних сроках эксперимента ($p \leq 0,05$).

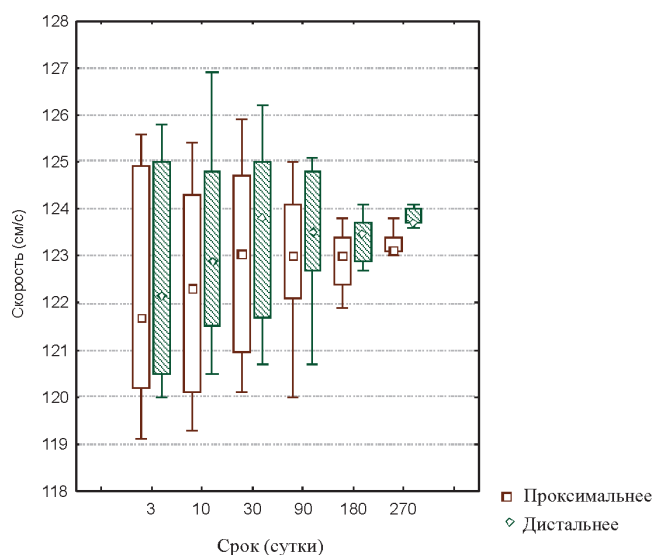


Рис. 2. Линейная скорость кровотока в аорте дистальнее и проксимальнее протеза на ранних и поздних сроках эксперимента ($p \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

Результаты ультразвуковой доплерографии линейной скорости кровотока в задней полой вене и аорте дистальнее и проксимальнее протеза на разных сроках эксперимента представлены на рис. 1 и 2.

В результате исследования не выявлено статистически значимой разницы линейной скорости кровотока в задней полой вене проксимальнее и дистальнее протеза на всех сроках наблюдения. Также не выявлено статистически значимой разницы линейной скорости кровотока в инфраренальном отделе аорты проксимальнее и дистальнее протеза на всех сроках наблюдения.

Результаты прямого инвазивного измерения давления в задней полой вене и среднего артериального давления в аорте дистальнее и проксимальнее протеза представлены на рис. 3 и 4.

В результате исследования статистически значимой разницы показателей давления в задней полой вене проксимальнее и дистальнее протеза на всех сроках наблюдения не выявлено. Также не выявлено статистически значимой разницы среднего артериального давления в аорте проксимальнее и дистальнее протеза на всех сроках наблюдения (группа сравнения).

а всех сроках исследования по данным ультразвуковой доплерографии наблюдали ровные контуры протеза, анастомозов, равномерное окрашивание самого протеза, а также дистального русла, отсутствие локального ускорения кровотока проксимальнее протеза (рис. 5, 6).

Цветовое дуплексное ультразвуковое сканирование является эффективной методикой для оценки

проходимости кондуитов при реконструктивно-пластических операциях на сосудах. С его помощью возможно неинвазивное определение сужения анастомозов, неравномерность прокрашивания самого протеза, прироста линейной скорости кровотока дистальнее стеноза. Дистальнее стеноза линейная скорость возрастает сначала относительно медленно, затем резко (при гемодинамически значимом стенозе в 2—2,5 раза), а затем падает вплоть до нуля при окклюзии, а среднее артериальное и венозное давление снижается [11]. Тромбоз протезов на ранних сроках обусловлен в первую очередь техническими ошибками формирования анастомозов, а на поздних сроках как хирургическими ошибками (несоответствие диаметра протеза диаметру сосуда, «избыточной»

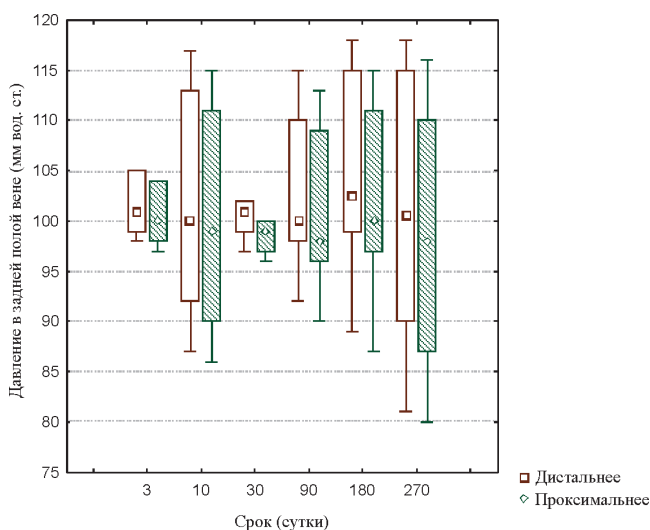


Рис. 3. Давление в задней полой вене дистальнее и проксимальнее протеза на ранних и поздних сроках эксперимента ($p \leq 0,05$).

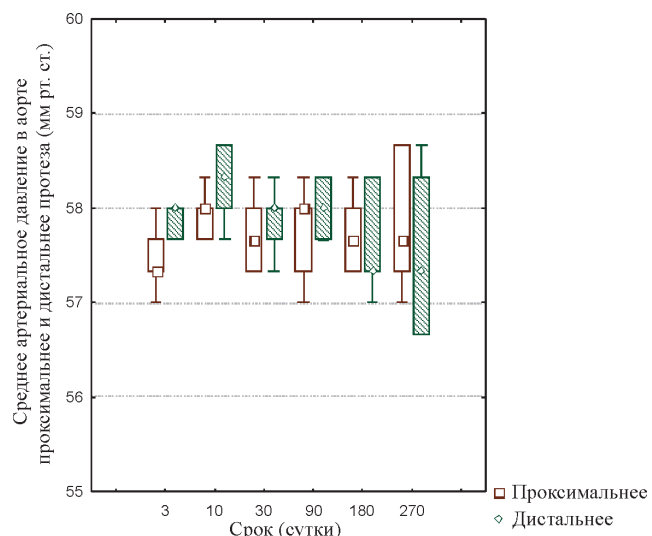


Рис. 4. Среднее артериальное давление в аорте дистальнее и проксимальнее протеза на ранних и поздних сроках эксперимента ($p \leq 0,05$).

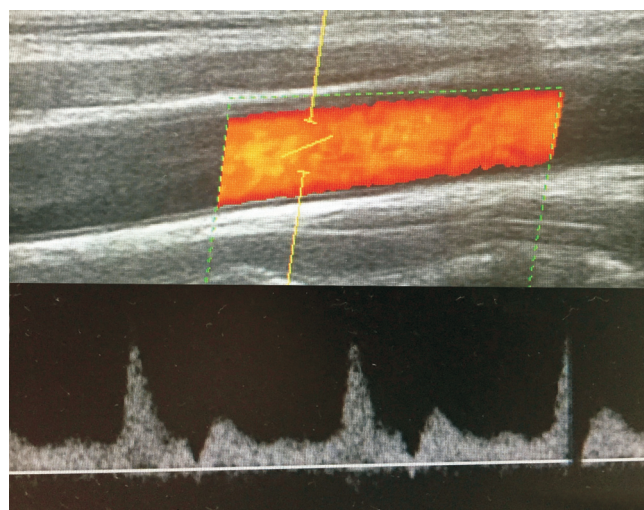


Рис. 5. Доплерография кровотока в протезе аорты кролика.

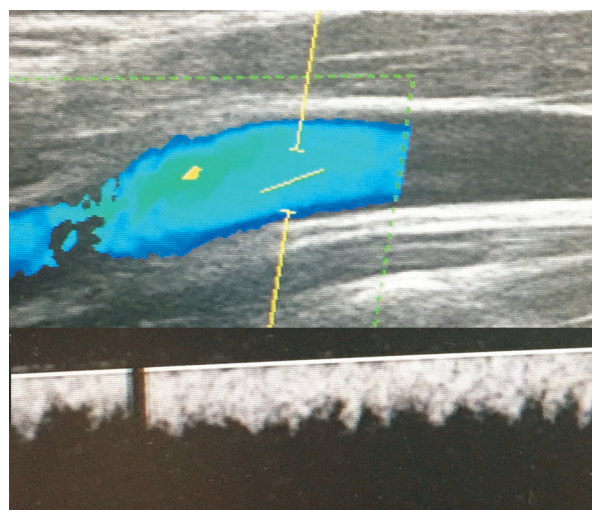


Рис. 6. Доплерография кровотока в протезе задней полой вены кролика.

длинной протеза и т.д.), так и гиперплазией неоинтимы протеза, зон анастомозов, а также коагулопатиями (TransAtlantic Inter Society Consensus, 2007 г).

Описанная в 1972 г. неоинтимальная гиперплазия в артериях является состоянием, при котором наблюдается активная пролиферация гладкомышечных клеток, эндотелия и фиброзной ткани в просвете протеза. Распространение беспорядочно растущей ткани в просвет кондуита приводит к его значительному сужению вплоть до полной окклюзии. При этом выраженность и частота развития этого состояния в области проксимального анастомоза является значительно более высокой. Неоинтимальная гиперплазия является самой частой причиной развития дисфункции протеза в первые 2 года после оперативного лечения [12, 13]. Развитие неоинтимальной гиперплазии в аутовенозных кондуитах хорошо известно в сердечно-сосудистой хирургии, где большая подкожная вена используется в качестве аортокоронарного шунта [14]. Неоинтимальная гиперплазия в протезах магистральных вен описана крайне скудно. Описанных клинических случаев длительного наблюдения состояния протезов магистральных вен недостаточно для того, чтобы убедительно высказаться за или против их повсеместного использования. Диагностика нарушения проходимости кондуита посредством ультразвуковой доплерографии с измерением скоростных характеристик кровотока до и после сосудистых анастомозов удобна для наблюдения как на ранних, так и на поздних сроках, т.к. позволяет оценить динамику изменений диаметра просвета кондуита, а также определить толщину возможной неоинтимальной гиперплазии.

В проведенном исследовании на всех сроках по данным ультразвуковой доплерографии наблюдались ровные контуры протеза, анастомозов, равномерное окрашивание самого протеза, а также дистального русла, отсутствие гемодинамически значимого (в 2—2,5 раза) ускорения кровотока дистальнее протеза. Статистически незначимое ускорение кровотока, а также снижение давления дистальнее протеза на поздних сроках обусловлено ростом толщины неоинтимы протеза с течением времени, что, однако, не приводит к гемодинамически значимому стенозу и тромбозу протеза. Протезы из пористого политетрафторэтилена (7 поколение, 2010) производства ЗАО «НПК «Экофлон» (Россия) оставались проходимы на сроке наблюдения 270 сут.

Полученные данные свидетельствуют о том, что протезы из пористого политетрафторэтилена могут быть использованы при реконструкции магистральных вен в клинической практике. Проходимость протезов из пористого политетрафторэтилена в венозной позиции сравнима и не отличается от таковой в артериальной позиции. Тромбозов и гемодинамически

значимого стенозирования протезов из пористого политетрафторэтилена в венозной позиции не отмечено на сроках до 270 сут. Полученные данные позволяют получить экспериментальное обоснование возможности использования синтетических кондуитов из пористого политетрафторэтилена при реконструкции магистральных вен в клинической практике.

References

1. Granov A.M., Maystrenko D.N., Polysalov V.N., Granov D.A., Pavlovskiy A.V., Shkol'nik M.I. et al. Operative interventions on vessels in oncological practice. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal*. 2011; 11(1): 70 — 4. (in Russian)
2. Voskanyan S.E., Kotenko K.V., Trofimenko Yu.G., Artem'ev A.I., Zabezinskiy D.A., Shabalin M.V. Experience of radical surgical treatment of locally advanced pancreatic head cancer with tumor invasion of the main vessels of the mesenteric portal system and visceral branches of the abdominal aorta. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2010; 1(2): 44-5. (in Russian)
3. Voskanyan S.E., Artem'ev A.I., Naydenov E.V., Shabalin M.V., Zabezinskiy D.A., Kolyshev I.Yu. The results of the use of PTFE-conduits in the reconstruction of the main veins of the abdominal cavity in locally advanced pancreatic cancer. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2015; 11(4): 668-72. (in Russian)
4. Voskanyan S.E., Trofimenko Yu.G., Artem'ev A.I., Naydenov E.V., Murzabekov M.B., Shabalin M.V. et al. The results of the use of PTFE-conduits in the reconstruction of the main veins of the mesenteric portal system in radical surgery of pancreatic cancer. *Almanakh instituta khirurgii im. A.V. Vishnevskogo*. 2011; 6(2): 165-6. (in Russian)
5. Radaelli S., Fiore M., Colombo C., Ford S., Palassini E., Sanfilippo R. et al. Vascular resection en-bloc with tumor removal and graft reconstruction is safe and effective in soft tissue sarcoma (STS) of the extremities and retroperitoneum. *Surgical Oncology*. 2016; 25(3): 125-31.
6. Hwang S, Ha T.Y., Jung D.H., Park J.I., Lee S.G. Portal vein interposition using homologous iliac vein graft during extensive resection for hilar bile duct cancer. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2007; 11: 888-92.
7. Chu C.K., Farnell M.B., Nguyen J.H., Stauffer J.A., Kooby D.A., Sclabas G.M. et al. Prosthetic graft reconstruction after portal vein resection in pancreaticoduodenectomy: a multicenter analysis. *Journal of the American College of Surgeons*. 2010; 211(3): 316-24.
8. Faynshteyn I.A., Tyurin I.E., Molchanov G.V., Sholokhov V.N., Kholyavka E.N., Ivanov Yu.V. et al. Reconstruction of splenoportomesenteric joints with pancreatoduodenal resection. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii*. 2008; 13(4): 33-6. (in Russ)
9. Andrews K.D., Feugier P., Black R.A., Hunt J.A. Vascular prostheses: performance related to cell-shear responses. *Journal of Surgical Research*. 2008; 149(1): 39-46.
10. Norgren L., Hiatt W.R., Dormandy J.A., Nehler M.R., Harris K.A., Fowkes F.G. TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Journal of Vascular Surgery*. 2007; 45(S): 5-67

11. Kulikov V.P. *Ultrasonic diagnostics of vascular diseases. A guide for doctors. 1st ed. [Ul'trazvukovaya diagnostika sosudistykh zabolevaniy. Rukovodstvo dlya vrachey. 1-ye izd.]*. Moscow: STROM; 1999. (in Russian)

12. Imparato A.M., Bracco A., Kim G.E., Zeff R. Intimal and neointimal fibrous proliferation causing failure of arterial reconstructions. *Surgery*. 1972; 72(6): 1007-1017.

13. Hirsch G.M., Karnovsky M.J. Heparin inhibition of vein graft lesions. *American Journal of Pathology*. 1991 Sep; 139(3): 581-7.

14. Meng Q.H., Irvine S., Tagalakis A.D., McAnulty R.J., McEwan J.R., Hart S.L. Inhibition of neointimal hyperplasia in a rabbit vein graft model following non-viral transfection with human iNOS cDNA. *Gene Therapy*. 2013; 20(10): 979-86.

Сведения об авторах

Восканян Сергей Эдуардович, доктор мед. наук, проф., заместитель главного врача по хирургической помощи — руководитель центра хирургии и трансплантологии ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России; зав. каф. хирургии с курсами онкохирургии, эндоскопии, хирургической патологии, клинической трансплантологии и органного донорства ИППО ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, e-mail: voskanyan_se@mail.ru

Колышев Илья Юрьевич, канд. мед. наук, доцент каф. хирургии с курсами онкохирургии, эндоскопии, хирургической патологии, клинической трансплантологии и органного донорства ИППО ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, e-mail: diffdiagnoz@mail.ru

Найденев Евгений Владимирович, канд. мед. наук, врач-хирург отделения хирургии, ст. науч. сотр. лаб. новых хирургических технологий центра хирургии и трансплантологии ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России e-mail: e.v.naydenov@mail.ru

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.151.5:612.115.3

Будник И.А.¹, Морозова О.Л.¹, Цымбал А.А.¹, Шенкман Б.², Эйнав Ю.³

Влияние концентратов фибриногена, фактора XIII и активируемого тромбином ингибитора фибринолиза на плотность и фибринолитическую устойчивость кровяного сгустка в модели гиперфибринолиза

¹ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119048, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8

² Институт тромбоза и гемостаза Медицинского центра им. Х. Шибы, 52621, Тель-Хашомер, Израиль

³ Холонский технологический институт, 5810201, Холон, Израиль

Цель исследования — изучение возможности коррекции формирования кровяного сгустка и его фибринолитической устойчивости с помощью концентратов фибриногена, фактора XIII и активируемого тромбином ингибитора фибринолиза (ТАФИ) в модели гиперфибринолиза *in vitro*. **Методика.** В образцы цитратной крови, полученной от 24 взрослых здоровых добровольцев, добавляли концентрат фибриногена, фактора XIII и/или ТАФИ. Фибринолиз индуцировали добавлением тканевого активатора плазминогена. Свертывание крови индуцировали рекальцификацией и добавлением препарата тканевого фактора. Формирование и лизис сгустка изучали методом ротационной тромбоэластометрии. **Результаты.** Индукция фибринолиза не влияла на время свертывания и скорость формирования сгустка, но значительно уменьшала максимальную плотность сгустка и вызывала его лизис. Концентрат фибриногена замедлял скорость лизиса сгустка; концентрат фактора XIII усиливал механическую прочность сгустка и замедлял скорость его лизиса, не влияя при этом на время начала лизиса; ТАФИ усиливал механическую прочность и значительно отдалял время начала лизиса, оказывая тем самым наибольший корригирующий эффект. **Заключение.** Полученные данные демонстрируют потенциальную возможность коррекции гемостатического потенциала крови при гиперфибринолизе с помощью концентратов фибриногена, фактора XIII и ТАФИ, которые могут стать альтернативой традиционным антифибринолитикам.

Ключевые слова: фибриноген; фактор XIII; активируемый тромбином ингибитор фибринолиза; гиперфибринолиз.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Будник И.А., Морозова О.Л., Цымбал А.А., Шенкман Б., Эйнав Ю. Влияние концентратов фибриногена, фактора XIII и активируемого тромбином ингибитора фибринолиза на плотность и фибринолитическую устойчивость кровяного сгустка в модели гиперфибринолиза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 44–50. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8522

Для корреспонденции: Будник Иван Александрович, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: budnik.ivan@gmail.com, Scopus Author ID: 24167930800.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.05.2017

Budnik I.A.¹, Morozova O.L.¹, Tsymbal A.A.¹, Shenkman B.², Einav Y.³

Effects of fibrinogen concentrate, factor XIII, and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor on clot firmness and fibrinolytic resistance in the model of hyperfibrinolysis

¹ Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str. 8, Moscow 119048, Russia

² National Hemophilia Center, Sheba Medical Center, Tel-Hashomer, 52621, Israel

³ Holon Institute of Technology, Holon, 5810201, Israel

Aim. To investigate effects of fibrinogen concentrate, factor XIII, and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (ТАФИ) on clot formation and fibrinolytic resistance using an *in vitro* model of hyperfibrinolysis. **Methods.** Citrated whole

blood from 24 adult healthy volunteers was supplemented with fibrinogen concentrate, factor XIII, and/or TAFI. Fibrinolysis was induced by tissue plasminogen activator. Clotting was induced by recalcification and addition of tissue factor and monitored using rotation thromboelastometry. **Results.** Induction of fibrinolysis did not affect clotting time and the rate of clot formation but significantly reduced the maximum clot firmness and caused lysis of a clot. Addition of fibrinogen concentrate to blood reduced the rate of clot lysis without affecting clot firmness or lysis onset time; addition of factor XIII improved clot firmness and reduced clot lysis rate without affecting lysis onset time; TAFI improved clot firmness and considerably delayed the onset of clot lysis thereby providing the greatest antifibrinolytic effect. **Conclusion.** Fibrinogen concentrate, factor XIII, and TAFI may potentially serve as an alternative to traditional antifibrinolytic agents and be beneficial for the treatment of patients with hyperfibrinolysis.

Keywords: fibrinogen; factor XIII; thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor; hyperfibrinolysis.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For citation: Budnik I.A., Morozova O.L., Tsymbal A.A., Shenkman B., Einav Y. Effects of fibrinogen concentrate, factor XIII, and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor on clot firmness and fibrinolytic resistance in the model of hyperfibrinolysis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(4): 44–50. (in Russian). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8522

For correspondence: Ivan Budnik, MD, PhD, Associate Professor, Department of Pathophysiology, Sechenov First Moscow State Medical University; Trubetskaya St. 8, Moscow, 119048, Russia; budnik.ivan@gmail.com

Information about the authors:

Budnik I., <http://orcid.org/0000-0002-6652-2667>

Morozova O.L., <http://orcid.org/0000-0003-2453-1319>

Tsymbal A.A., <http://orcid.org/0000-0002-2928-1067>

Shenkman B., <http://orcid.org/0000-0002-2888-8502>

Einav Y., <http://orcid.org/0000-0001-8222-7695>

Received 16.05.2017

Введение

Гиперфибринолиз — это состояние, характеризующееся избыточной активностью плазмина, ускоренным лизисом фибрина и/или фибриногена и, как следствие, склонностью к кровотечениям. Данное состояние осложняет течение различных форм патологии и служит независимым предиктором их летального исхода [1]. Высокий риск кровотечений в условиях гиперфибринолиза, обуславливает необходимость тщательного мониторинга и коррекции гемостатического потенциала крови у пациентов с данной патологией [2—5].

Для коррекции гемостатического потенциала крови в условиях гиперфибринолиза традиционно используются различные фармакологические антифибринолитики — ингибиторы протеаз (апротинин и его аналоги) и синтетические аналоги лизина (ϵ -аминокапроновая и транексамовая кислоты). Несмотря на доказанную клиническую эффективность [6—9], эти препараты не лишены недостатков. Было показано, что применение апротинина ассоциировано с повышенным риском развития почечной недостаточности, инфаркта миокарда, инсульта, ранней и отдаленной смертности по сравнению с синтетическими аналогами лизина [10]. В свою очередь, синтетические аналоги лизина могут вызывать тромботические осложнения [11], оказывать про-

фибринолитическое действие [12, 13], вызывать судорожный [14, 15] и другие нежелательные эффекты. Необходим поиск новых, более безопасных и эффективных подходов к коррекции гемостатического потенциала при гиперфибринолизе.

Процесс лизиса кровяного сгустка зависит, с одной стороны, от активности плазмина, с другой — от фибринолитической устойчивости самого сгустка [16]. Последняя во многом определяется пространственной организацией фибриновой сети, а также количеством и доступностью остатков лизина в структуре нитей фибрина, служащих сайтами для связывания плазминогена и тканевого активатора плазминогена (tissue plasminogen activator, tPA) [17]. Мы полагаем, что средства, повышающие фибринолитическую устойчивость кровяного сгустка, могут стать альтернативой традиционным антифибринолитикам и могут быть использованы для коррекции гемостатического потенциала крови при гиперфибринолизе.

Цель исследования — изучение возможностей коррекции формирования кровяного сгустка и его фибринолитической устойчивости с помощью концентратов фибриногена, фактора XIII и активируемого тромбином ингибитора фибринолиза (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor, TAFI) в модели tPA-индуцированного гиперфибринолиза *in vitro*.

Методика

Исследование одобрено этическим комитетом медицинского центра им. Х. Шибы (Тель-Хашомер, Израиль) и проведено в соответствии с принципами Хельсинской декларации. Перед включением в исследование у всех участников было получено письменное информированное согласие.

Взятие крови

В исследовании приняли участие 24 здоровых добровольца, не имевших в анамнезе нарушений в системе гемостаза и не принимавших никаких лекарственных препаратов в течение 14 дней перед включением в исследование. Взятие крови осуществляли на тощак пункцией срединной локтевой вены с помощью иглы-бабочки 20G при минимальном по времени наложении жгута. Кровь собирали в вакуумные пробирки, содержащие 3,2% раствор трехзамещенного цитрата натрия. Соотношение антикоагулянта и крови составляло 1:9. Перед началом манипуляций образцы крови выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре.

Ротационная тромбоэластометрия

Формирование кровяного сгустка исследовали с помощью ротационного тромбоэластометра ROTEM (Pentapharm, Munich, Germany). Для этого в кювету тромбоэластометра помещали 20 мкл реагента NATEM (хлорид кальция), 20 мкл разведенного 1:100 реагента EXTEM, содержащего тканевой фактор, после чего добавляли 300 мкл крови и тщательно перемешивали путем пипетирования. Формирование и лизис кровяного сгустка регистрировали при температуре 37°C в течение 60 мин в виде кривой — тэмограммы. Оценивали следующие параметры тэмограммы: время свертывания (СТ, с; время от начала регистрации тэмограммы до достижения амплитуды 2 мм), угол альфа (ALP, градусы; угол наклона касательной, проведенной к тэмограмме через точку, в которой амплитуда тэмограммы достигла 2 мм), максимальная плотность сгустка (MCF, мм; максимальная амплитуда тэмограммы), время начала лизиса (LOT, мин; время от СТ до снижения амплитуды тэмограммы на 15% от MCF), индекс лизиса на 30-й минуте (LI30, %; амплитуда тэмограммы через 30 мин после СТ, выраженная в процентах от MCF). Все эксперименты были выполнены в стандартных условиях одним исследователем.

Модель гиперфибринолиза *in vitro*

О наличии фибринолиза свидетельствует снижение максимальной амплитуды тэмограммы на 15% и более от MCF [17]. Гиперфибринолиз индуцировали с помощью tPA (Actilyse; Boehringer Ingelheim, Ingel-

heim, Germany), который добавляли в исследуемую кровь в конечных концентрациях 50, 100, 150 и 200 МЕ/мл. Сразу после добавления tPA образец крови перемешивали путем пипетирования и помещали в кюветы тромбоэластометра, содержащие индукторы свертывания, и начинали регистрацию тэмограммы. Для исследования возможностей коррекции формирования кровяного сгустка в условиях гиперфибринолиза в образцы крови также добавляли следующие препараты: концентрат фибриногена (Haemocomplettan P; CSL Behring GmbH, Marburg, Germany) — 3 мг/мл, концентрат фактора XIII (Fibrogammin P; CSL Behring GmbH, Marburg, Germany) — 2 МЕ/мл, ТАФИ (Sigma Aldrich, Rehovot, Israel) — 1 Ед/мл. В контрольные образцы крови вместо tPA и/или гемостатических препаратов добавляли соответствующее количество фосфатного буфера (PBS; pH 7.4).

Статистический анализ

Статистический анализ выполнен с помощью программы Statistica 10 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Результаты исследования представлены в виде $M \pm SD$, где M — выборочное среднее, SD — выборочное стандартное отклонение. Для сравнения эффектов от добавления в кровь различных доз tPA и концентратов фибриногена, фактора XIII и ТАФИ на показатели тэмограммы использовали однофакторный дисперсионный анализ. Апостериорные сравнения проводили с помощью критерия Тьюки. Различия средних величин считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для выбора оптимальной дозы tPA была исследована зависимость показателей тэмограммы от его добавляемой концентрации. На рис. 1 (А, Б) видно, что добавление в кровь tPA не оказывало влияния на показатели СТ и ALP ни в одной из использованных доз. При добавлении tPA в дозе 50 МЕ/мл MCF существенно не отличался от контроля, тогда как добавление tPA в дозах 100, 150 и 200 МЕ/мл вызывало прогрессирующее снижение данного показателя. В отсутствие tPA спонтанный лизис кровяного сгустка отсутствовал; добавление tPA в дозе 50 МЕ/мл индуцировало незначительный лизис сгустка; добавление tPA в дозах 100, 150 и 200 МЕ/мл вызывало дозозависимое усиление фибринолиза, что выражалось в снижении показателей LI30 и LOT (рис. 1, Б). Учитывая цель данного исследования, в дальнейших сериях экспериментов для индукции гиперфибринолиза мы использовали tPA в дозе 150 МЕ/мл, позволяющей оценить влияние исследуемых препаратов на формирование и лизис кровяного сгустка.

Время свертывания (СТ) в интактной крови составило $200 \text{ с} \pm 35 \text{ с}$. Индукция фибринолиза не отражалась на величине данного показателя. Добавление концентратов фибриногена, фактора XIII и ТАФИ как по отдельности, так и в комбинации также не оказывало заметного влияния на длительность СТ.

Угол альфа (ALP) в интактной крови составил $68,8^\circ \pm 3,6^\circ$. Близкие значения данного показателя бы-

ли зарегистрированы и в присутствии tPA. Добавление в кровь концентратов фибриногена, фактора XIII и ТАФИ как по отдельности, так и в комбинации не вызывало существенных изменений данного показателя.

Максимальная плотность сгустка (МСФ) в интактной крови составила $58,3 \text{ мм} \pm 4,5 \text{ мм}$. В присутствии tPA данный показатель снижался до $38,7 \text{ мм} \pm 6,7 \text{ мм}$. Добавление концентрата фибриногена в этих условиях

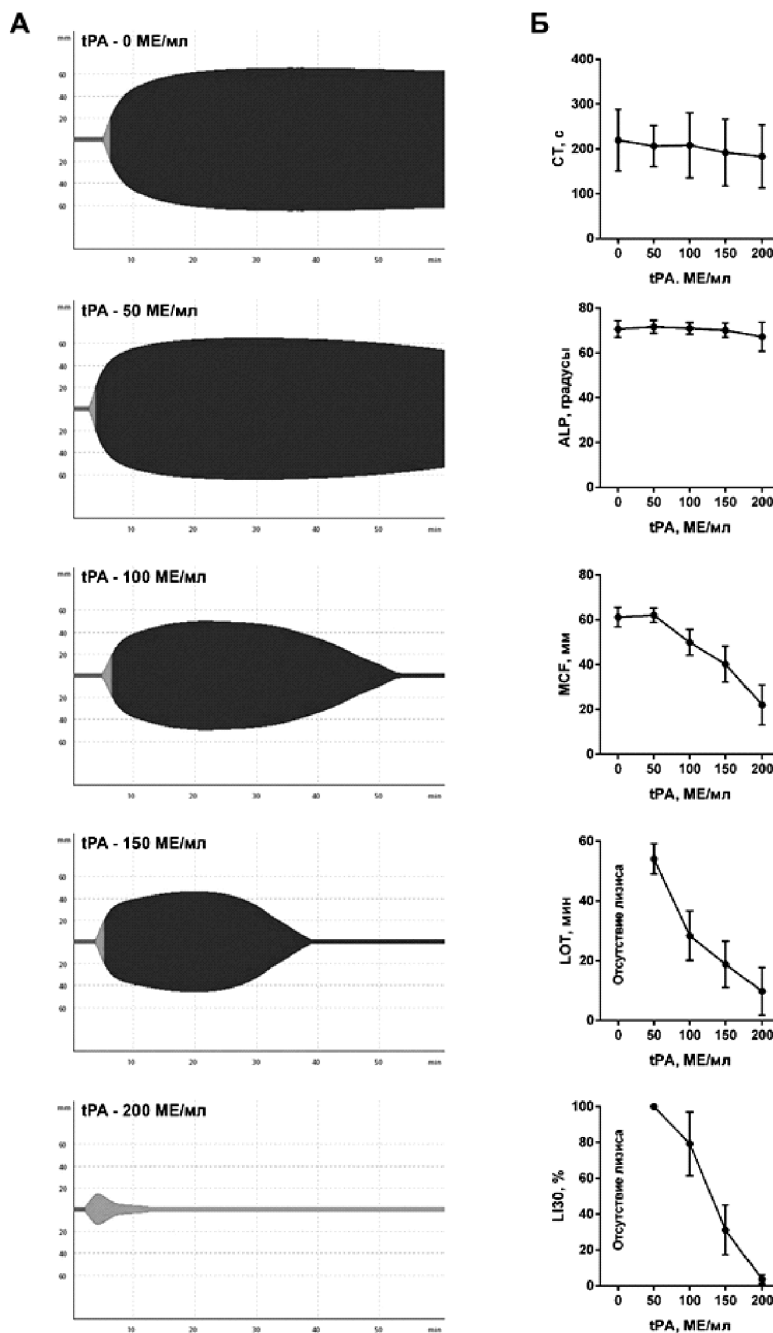


Рис. 1. Формирование и лизис кровяного сгустка в присутствии tPA. А – репрезентативные тэмограммы; Б – исследованные параметры тэмограммы. Результаты представлены в виде ($M \pm SD$).

вызывало некоторое увеличение MCF, однако это изменение не достигало уровня статистической значимости. Добавление концентрата фактора XIII и TAFI вызывало значительное увеличение MCF, так что значение данного показателя не отличалось от такового в интактной крови (рис. 2, А). Одновременное добавление концентратов фибриногена и фактора XIII, а также одновременное добавление концентрата фактора XIII и TAFI вызывало такой же эффект, как и добавление каждого из этих препаратов по отдельности.

В интактной крови (в отсутствие tPA) спонтанный лизис сгустка не наблюдался. Добавление tPA индуцировало лизис кровяного сгустка, при этом время начала лизиса (LOT) составило 21,6 мин ± 5,7 мин. При добавлении концентратов фибриногена и фактора XIII данный показатель несколько возрастал, однако различия с контролем не достигли уровня статистической значимости (рис. 2, Б). Несколько большее значение LOT было зарегистрировано при одновременном добавлении концентратов фибриногена и фактора XIII — 32,9 мин ± 6,2 мин (p = 0,020), что, однако, существ-

венно не отличалось от значения LOT при добавлении этих препаратов по отдельности. Добавление TAFI статистически значимо увеличивало LOT до 46,2 мин ± 7,3 мин. При одновременном добавлении концентрата фактора XIII и TAFI значение LOT существенно не отличалось от такового при добавлении TAFI отдельно и было существенно больше, чем при добавлении концентрата фактора XIII отдельно (p = 0,017).

В присутствии tPA индекс лизиса на 30-й мин (LI30) составил 24,1% ± 15,6%. Добавление концентратов фибриногена, фактора XIII и TAFI по отдельности вызывало существенное увеличение данного показателя для каждого сравнения (рис. 2, В). Эффект от одновременного добавления концентратов фибриногена и фактора XIII не отличался от такового при добавлении каждого из них по отдельности. При одновременном добавлении концентрата фактора XIII и TAFI значение LI30 существенно превышало таковое при добавлении концентрата фактора XIII отдельно и не отличалось от значения LI30 при добавлении TAFI отдельно.

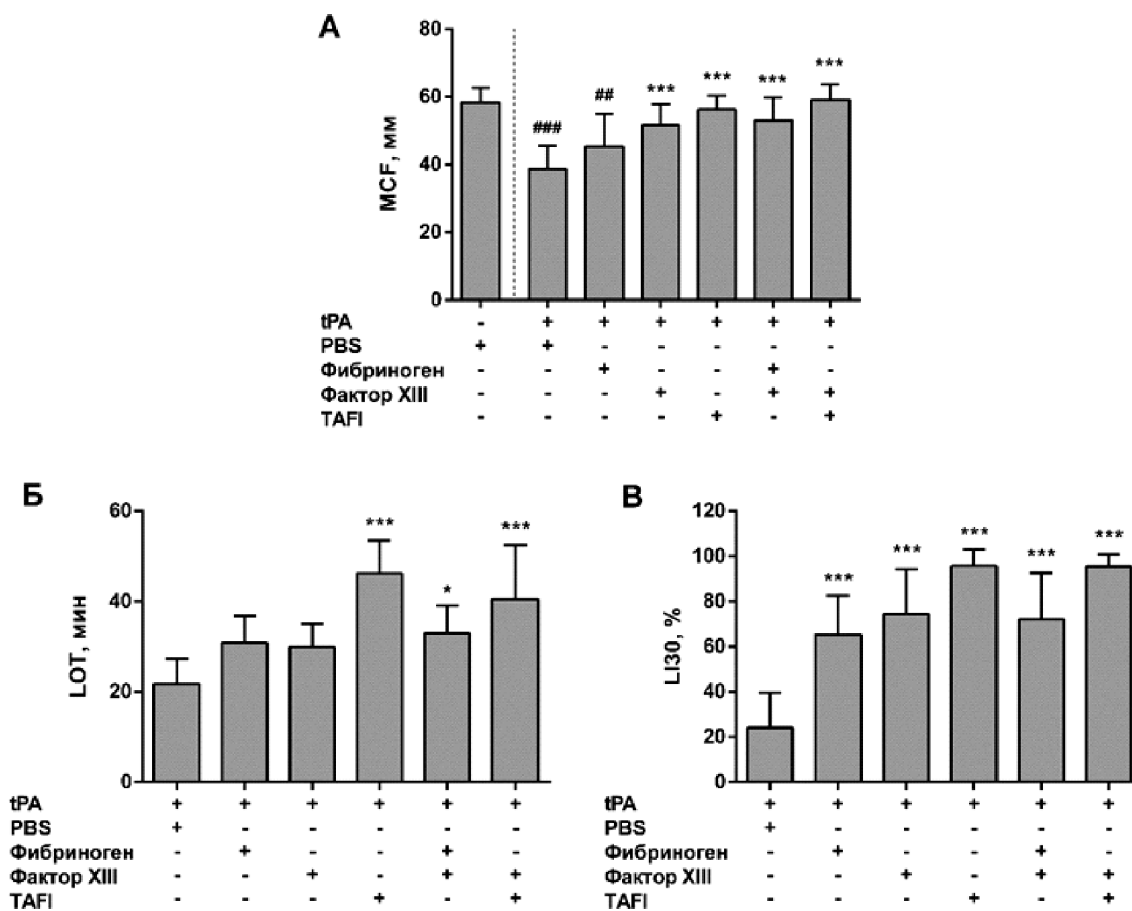


Рис. 2. Влияние концентратов фибриногена, фактора XIII и TAFI на формирование и лизис кровяного сгустка в условиях tPA-индуцированного гиперфибринолиза. А — Максимальная плотность сгустка (MCF, мм). Б — Время начала лизиса (LOT, мин). В - Индекс лизиса на 30-й мин (LI30, %). Результаты представлены в виде M ± SD. *p < 0,05, ***p < 0,001 — сравнение с tPA. ##p < 0,01, ###p < 0,001 — сравнение с PBS.

Проведенные исследования показали, что активация фибринолиза вызывает значительное уменьшение максимальной плотности сгустка (MCF) и обуславливает раннее начало его лизиса (LOT и L30). Схожие изменения свойств кровяного сгустка в присутствии tPA были показаны ранее [18]. Очевидным объяснением уменьшения плотности сгустка в данных условиях является то, что параллельно с процессом полимеризации фибрина и формированием фибриновой сети происходит разрушение образовавшихся нитей фибрина (фибринолиз) и молекул фибриногена (фибриногенолиз) [18], а также инактивация активированного фактора XIII [19] вследствие повышенной плазменной активности плазмينا. В то же время добавление tPA в использованной дозе не отражается на продолжительности латентного периода, предшествующего формированию кровяного сгустка, и кинетике начальных этапов формирования сгустка. Полученные результаты согласуются с данными о том, что индукция фибринолиза не влияет на генерацию тромбина и активность факторов V и VIII, а следовательно, и скорость формирования сгустка [18].

Известно, что время, необходимое для лизиса фибрина, прямо пропорционально концентрации фибриногена [20]. Введение концентрата фибриногена пациентам с политравмой, а также во время операций с применением аппарата искусственного кровообращения позволяет уменьшить объем кровопотери. В то же время применение данного препарата не влияет на потребность в переливании компонентов крови при операциях по трансплантации печени [21]. Проведенные нами исследования показали, что в условиях гиперфибринолиза добавление фибриногена замедляет скорость лизиса сгустка, не оказывая при этом существенного влияния на его максимальную плотность и время начала лизиса. Вероятно, что обнаруженное нами снижение скорости лизиса могло быть обусловлено уменьшением диаметра и увеличением количества нитей фибрина в сгустке [19]. Последнее, однако, сопряжено с увеличением количества остатков лизина в структуре сгустка, необходимых для генерации плазмина, в результате чего время начала лизиса практически не изменилось.

Фактор XIII (фибринстабилизирующий фактор) под влиянием тромбина переходит в активную форму (XIIIa) и катализирует образование прочных ковалентных связей между остатками глутаминовой кислоты и лизина соседних молекул фибрина, что способствует уменьшению пористости сгустка и увеличению плотности фибриновой сети [22]. Кроме того, фактор XIII обеспечивает связывание α_2 -антиплазмينا с фибрином, инактивирующего плазмин непосредственно на поверхности фибриновых нитей и повышающего тем самым фибринолитическую устойчивость сгустка [23]. Дефицит фактора XIII ассоциирован с повышенным риском внутрисклеральных и послеоперационных кровотечений [24]. В данной работе

мы показали, что добавление концентрата фактора XIII в условиях гиперфибринолиза повышает плотность кровяного сгустка и замедляет скорость его лизиса, хотя и не влияет на время начала лизиса. Возможным объяснением данного эффекта является то, что добавление XIII фактора не влияет на количество остатков лизина и поэтому не препятствует tPA-индуцированной генерации плазмина на поверхности фибриновых нитей, но замедляет диффузию плазмина и вызывает его частичную инактивацию за счет присоединения к фибрину большего количества α_2 -антиплазмина.

TAFI (карбоксипептидаза B2) — эндогенный антифибринолитик, который под влиянием комплекса тромбин-тромбомодулин (и в меньшей степени под действием свободного тромбина и плазмина) превращается в активную форму (TAFIa) и отщепляет C-концевые остатки лизина в молекулах фибрина, служащие для связывания tPA, плазминогена и плазмина [25]. С одной стороны, это ограничивает взаимодействие tPA и плазминогена на поверхности фибриновых нитей и, как следствие, снижает генерацию плазмина, а с другой — препятствует связыванию плазмина с фибрином, повышая тем самым устойчивость нитей фибрина к лизису. Действительно, проведенные нами исследования показали, что, в отличие от концентратов фибриногена и фактора XIII, применение TAFI не только вызывает увеличение максимальной плотности сгустка, но и значительно отодвигает время начала лизиса, так что даже спустя 30 мин от начала формирования сгустка амплитуда тэмограммы не снижалась более чем на 5%.

Наше исследование имеет некоторые ограничения. В частности, использованная в работе модель гиперфибринолиза не учитывает характер основной патологии, с которой гиперфибринолиз ассоциирован. Так, например, наряду с гиперфибринолизом существенная роль в развитии травматической коагулопатии отводится гипотермии, метаболическому ацидозу, гемодилюции, нарушению баланса между различными факторами свертывания и противосвертывающими механизмами. Остается открытым вопрос о том, каким образом данные факторы модифицируют эффект от применения концентратов фибриногена, фактора XIII и TAFI в условиях гиперфибринолиза.

Заключение

На модели tPA-индуцированного гиперфибринолиза *in vitro*, с помощью метода ротационной тромбоэластометрии показано, что повышение активности плазмина существенно не отражается на продолжительности латентного периода, необходимого для генерации тромбина, и скорости формирования сгустка, но значительно уменьшает максимальную плотность сгустка и вызывает его ускоренный лизис. В этих условиях кон-

центрат фибриногена замедляет скорость лизиса сгустка; концентрат фактора XIII усиливает механическую прочность сгустка и замедляет скорость его лизиса, не влияя при этом на время начала лизиса; ТАФИ усиливает механическую прочность и значительно отодвигает время начала лизиса, оказывая тем самым наибольший корректирующий эффект. Полученные данные демонстрируют потенциальную возможность коррекции обнаруженных нарушений гемостатического потенциала крови при гиперфибринолизе с помощью вышеуказанных препаратов и могут служить ориентиром при планировании клинических исследований.

References

1. Veigas P. V., Callum J., Rizoli S., Nascimento B., da Luz L.T. A systematic review on the rotational thrombelastometry (ROTEM®) values for the diagnosis of coagulopathy, prediction and guidance of blood transfusion and prediction of mortality in trauma patients. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2016; 24(1): 114.
2. Davenport R.A., Guerreiro M., Frith D., Rourke C., Platton S., Cohen M., et al. Activated protein C drives the hyperfibrinolysis of acute traumatic coagulopathy. *Anesthesiology.* 2017; 126(1): 115-27.
3. Ranucci M. Hemostatic and thrombotic issues in cardiac surgery. *Semin Thromb Hemost.* 2015; 41(1): 84-90.
4. Wada T., Gando S., Ono Y., Maekawa K., Katabami K., Hayakawa M., et al. Disseminated intravascular coagulation with the fibrinolytic phenotype predicts the outcome of patients with out-of-hospital cardiac arrest. *Thromb J.* 2016; 14: 43.
5. Ferro D., Celestini A., Violi F. Hyperfibrinolysis in Liver Disease. *Clin Liver Dis.* 2009; 13(1): 21-31.
6. Henry D.A., Carless P.A., Moxey A.J., O'Connell D., Stokes B.J., Fergusson D.A., et al. Anti-fibrinolytic use for minimising perioperative allogeneic blood transfusion. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011; (3):CD001886.
7. Wu Q., Zhang H.-A., Liu S.-L., Meng T., Zhou X., Wang P. Is tranexamic acid clinically effective and safe to prevent blood loss in total knee arthroplasty? A meta-analysis of 34 randomized controlled trials. *Eur J Orthop Surg Traumatol.* 2015; 25(3): 525-41.
8. Roberts I., Edwards P., Prieto D., Joshi M., Mahmood A., Ker K., et al. Tranexamic acid in bleeding trauma patients: an exploration of benefits and harms. *Trials.* 2017; 18(1): 48.
9. Godier A., Hunt B.J. Aprotinin as an alternative to tranexamic acid in cardiac surgery — Is this where we started from? *Anaesth Crit Care Pain Med.* 2017; 36(2): 79-81.
10. European Society of Anaesthesiology task force reports on place of aprotinin in clinical anaesthesia. Aprotinin: is it time to reconsider? *Eur J Anaesthesiol.* 2015;32(9):591-5.
11. Upadhyay S.P., Mallick P.N., Jagia M., Singh R.K.A. Acute arterial thrombosis associated with inadvertent high dose of tranexamic acid. *Indian J Crit Care Med.* 2013; 17(4): 237-9.
12. Silva M.M.C.G., Thelwell C., Williams S.C., Longstaff C. Regulation of fibrinolysis by C-terminal lysines operates through plasminogen and plasmin but not tissue-type plasminogen activator. *J Thromb Haemost.* 2012; 10(11): 2354-60.
13. Hijazi N., Abu Fanne R., Abramovitch R., Yarovoi S., Higazi M., Abdeen S., et al. Endogenous plasminogen activators mediate progressive intracerebral hemorrhage after traumatic brain injury in mice. *Blood.* 2015; 125(16): 2558-67.
14. Myles P.S., Smith J.A., Forbes A., Silbert B., Jayarajah M., Painter T., et al. Tranexamic Acid in Patients Undergoing Coronary-Artery Surgery. *N Engl J Med.* 2017; 376(2): 136-48.
15. Sharma V., Katznelson R., Jerath A., Garrido-Olivares L., Carroll J., Rao V., et al. The association between tranexamic acid and convulsive seizures after cardiac surgery: a multivariate analysis in 11 529 patients. *Anaesthesia.* 2014; 69(2): 124-30.
16. Bucay I., O'Brien E.T., Wulfe S.D., Superfine R., Wolberg A.S., Falvo M.R., et al. Physical determinants of fibrinolysis in single fibrin fibers. *PLoS One.* 2015; 10(2):e0116350.
17. Weisel J.W., Litvinov R.I. Fibrin Formation, Structure and Properties. *Subcell Biochem.* 2017; 82: 405-56.
18. Godier A., Parmar K., Manandhar K., Hunt B.J. An in vitro study of the effects of t-PA and tranexamic acid on whole blood coagulation and fibrinolysis. *J Clin Pathol.* 2017; 70(2): 154-61.
19. Hur W.S., Mazinani N., Lu X.J.D., Britton H.M., Byrnes J.R., Wolberg A.S. et al. Coagulation factor XIIIa is inactivated by plasmin. *Blood.* 2015; 126(20): 2329-37.
20. Kim P.Y., Stewart R.J., Lipson S.M., Nesheim M.E. The relative kinetics of clotting and lysis provide a biochemical rationale for the correlation between elevated fibrinogen and cardiovascular disease. *J Thromb Haemost.* 2007; 5(6): 1250-6.
21. Sabate A., Gutierrez R., Beltran J., Mellado P., Blasi A., Acosta F. et al. Impact of Preemptive Fibrinogen Concentrate on Transfusion Requirements in Liver Transplantation: A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Am J Transplant.* 2016; 16(8): 2421-9.
22. Hethershaw E.L., Cilia La Corte A.L., Duval C., Ali M., Grant P.J., Ariens R.A.S. et al. The effect of blood coagulation factor XIII on fibrin clot structure and fibrinolysis. *J Thromb Haemost.* 2014; 12(2): 197-205.
23. Rijken D.C., Abdul S., Malfliet J.J.M.C., Leebeek F.W.G., Uitte de Willige S. Compaction of fibrin clots reveals the antifibrinolytic effect of factor XIII. *J Thromb Haemost.* 2016; 14(7): 1453-61.
24. Ichinose A., Japanese Collaborative Research Group on AH13. Autoimmune acquired factor XIII deficiency due to anti-factor XIII/13 antibodies: A summary of 93 patients. *Blood Rev.* 2017; 31(1): 37-45.
25. Marar T.T., Boffa M.B. Identification of a thrombomodulin interaction site on thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor that mediates accelerated activation by thrombin. *J Thromb Haemost.* 2016; 14(4): 772-83.

Сведения об авторах:

Морозова Ольга Леонидовна, доктор мед. наук, доцент, проф. каф. патофизиологии лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: morozova_ol@list.ru, Scopus Author ID: 55805379800

Шенкман Борис, доктор мед. наук, проф., ст. науч. сотр. Института тромбоза и гемостаза Медицинского центра им. Х. Шибы (Израиль), e-mail: borshenk@gmail.com, Scopus Author ID: 7005545029

Эйнав Юлия, PhD, ст. лектор инженерного факультета Холонского технологического института, 5810201, Холон, Израиль

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.12-008.46:576.53

Лыков А.П.^{1,2}, Чернявский А.М.², Повещенко О.В.^{1,2}, Фомичев А.В.²,
Суровцева М.А.^{1,2}, Бондаренко Н.А.^{1,2}, Ким И.И.^{1,2}, Карева Ю.Е.², Таркова А.Р.²

Характеристика костномозгового клеточного трансплантата больных хронической сердечной недостаточностью до и после кратковременной экспозиции с эритропоэтином

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук, 630060, г. Новосибирск, Россия, ул. Тимакова, д. 2

² ФГБУ «Сибирский федеральный биомедицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, 630055, г. Новосибирск, Россия, ул. Речкуновская, д. 15

Аутологичные костномозговые стволовые клетки являются альтернативным способом терапии пациентов с сердечной недостаточностью. **Цель** работы — изучение фенотипа и функциональных свойств костномозговых мононуклеарных клеток (КМ-МНК) больных хронической сердечной недостаточностью (ХСН) до и после кратковременной экспозиции с эритропоэтином *in vitro*. **Методика.** КМ-МНК выделяли на градиенте плотности фиколл-верографин ($\rho = 1,077$ г/л). Фенотип КМ-МНК, клеточный цикл и апоптоз CD34+ клеток определяли до и после экспозиции с эритропоэтином на проточном цитометре. Проллиферативный потенциал КМ-МНК до и после экспозиции с эритропоэтином оценивали в спонтанном и стимулирующем тесте. Пролиферацию, миграцию и ангиогенный потенциал клеток EA.hy 929 изучали в тесте «раневого дефекта» монослоя клеток и на матрикеле под влиянием 30% кондиционных сред от КМ-МНК. **Результаты.** Показано, что КМ-МНК представляют собой смесь гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) на разных этапах созревания и дифференцировки, и мезенхимных стволовых клеток (МСК). Под действием эритропоэтина увеличивается количество CD34+ клеток в G0G1 фазе клеточного цикла, CD45+/EpoR+, CD31-/CD184+, CD31+/CD184+ и CD34+/CD184-, и уменьшается количество CD34+/CD133+, CD34+/EpoR-. Кондиционная среда от КМ-МНК способствует пролиферации, миграции и формированию сосудисто-подобных структур клетками EA.hy 929. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что кратковременная экспозиция КМ-МНК больных ХСН задерживает CD34+ клетки в стадии покоя, увеличивает пул ЭПК, экспрессирующих «хоуминг» рецептор, а кондиционная среда от КМ-МНК стимулирует пролиферацию, миграцию и ангиогенный потенциал EA.hy 929, что следует учитывать при выборе методов усиления «приживаемости» клеточного трансплантата.

Ключевые слова: сердечная недостаточность; костномозговые стволовые/прогениторные клетки; цитопротекторный эффект эритропоэтина.

Для цитирования: Лыков А.П., Чернявский А.М., Повещенко О.В., Фомичев А.В., Суровцева М.А., Бондаренко Н.А., Ким И.И., Карева Ю.Е., Таркова А.Р. Характеристика костномозгового клеточного трансплантата больных хронической сердечной недостаточностью до и после кратковременной экспозиции с эритропоэтином. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 51–61. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8523

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке РФФ (Заявка № 16-15-00057).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Лыков Александр Петрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточных технологий Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» СО РАН; ст. науч. сотр. лаб. клеточных технологий Центра новых технологий «СФБИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, e-mail: aplykov2@mail.ru

Поступила 04.05.2017

Lykov A.P.^{1,2}, Cherniavsky A.M.², Poveshchenko O.V.^{1,2}, Fomichev A.V.², Surovtseva M.A.^{1,2},
Bondarenko N.A.^{1,2}, Kim I.I.^{1,2}, Kareva Yu.E.², Tarkova A.R.²

Characteristics of bone marrow cell graft from patients with chronic heart failure before and after a short-term exposure to erythropoietin

¹ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Timakova Str. 2, Novosibirsk 630060, Russia

² E.N. Meshalkin Siberian Federal Biomedical Research Center, Rechkunovskaya Str. 15, Novosibirsk 630055, Russia

Autologous bone marrow stem cells are an alternative therapy for patients with heart failure. The **aim** of this work was to study the phenotype and functional properties of bone marrow mononuclear cells (BM-MNCs) from patients with chronic heart failure (CHF) before and after a short-term *in vitro* exposure to erythropoietin. **Methods.** BM-MNCs were isolated using density gradient. The BM-MNC phenotype, cell cycle, and apoptosis of CD34+ cells were evaluated before and after exposure to erythropoietin with a flow cytometer. Proliferation of BM-MNCs before and after the erythropoietin exposure was evaluated in a spontaneous and stimulating test. Proliferation, migration, and angiogenic potential of EA.hy 929 cells were studied in the wound closure test and in the tubule formation test under the influence of 30% conditioned medium from BM-MNCs. **Results.** BM-MNCs represented a mixture of hematopoietic stem cells (HSCs), endothelial progenitor cells (EPCs) at different stages of maturation and differentiation, and mesenchymal stem cells (MSCs). Erythropoietin increased the number of CD34+ cells in the G0/G1 cell cycle phase, CD45+/EpoR+, CD31-/CD184+, CD31+/CD184+, and CD34+/CD184-, and decreased the number of CD34+/CD133+ and CD34+/EpoR. The erythropoietin exposure of BM-MNCs reduced their proliferative capacity. The BM-MNCs-conditioned medium promoted EA.hy 929 cell proliferation, migration, and formation of vascular-like structures. **Conclusion.** A short-term exposure of BM-MNCs delayed the resting stage of CD34+ cells, increased the pool of EPCs expressing the homing receptor while the BM-MNC conditioned medium stimulated EA.hy 929 proliferation, migration and tubule formation, which should be taken into account when selecting methods to enhance survival of cellular grafts.

Keywords: heart failure; bone marrow stem/progenitor cells; cytoprotective effect of erythropoietin.

For citation: Lykov A.P., Cherniavsky A.M., Poveshchenko O.V., Fomichev A.V., Surovtseva M.A., Bondarenko N.A., Kim I.I., Kareva Yu.E., Tarkova A.R. Characterization of bone marrow cells graft from patients with chronic heart failure before and after short-term exposure with erythropoietin. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(4): 51–61. (in Russian). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8523

For correspondence: Alexander P. Lykov, Candidate of Medical Science, leading researcher of the laboratory of cellular technology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Timakova str., 2, Novosibirsk, 630060, Russian Federation, e-mail: aplykov2@mail.ru

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

Funding. Work is executed at financial support Russian Science Foundation № 16-15-00057.

Information about authors:

Lykov A.P. <http://orcid.org/0000-0003-4897-8676>

Cherniavsky A.M. <http://orcid.org/0000-0001-9818-8678>

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

Fomichev A.V. Author ID: 57191833744

Surovtseva M.A. <http://orcid.org/0000-0002-4752-988X>

Bondarenko N.A. <http://orcid.org/0000-0002-8443-656X>

Kim I.I. <http://orcid.org/0000-0002-7380-2763>

Kareva Yu.E. Author ID: 55943873600

Tarkova A.R. Author ID: 56497020700

Received 04.05.2017

Введение

Известно, что смертность больных хронической сердечной недостаточностью (ХСН) в Российской Федерации высока [1]. Это диктует необходимость разработки новых способов терапии, включая и достижения в области клеточных технологий. Аутологичные костномозговые стволовые клетки (СК) являются альтернативным способом терапии пациентов с ХСН [2]. Так, на фоне введения аутологичных костномозговых мононуклеарных клеток (КМ-МН) как интрамиокардиально, так и комбинацией интрамиокардиального введения с интракоронарным введением больным с ХСН отмечено улучшение сократи-

тельной способности левого желудочка [3]. Проведено сравнительное исследование [4] клинической эффективности интрамиокардиального введения КМ-МНК и обогащенной фракции CD31 клеток предшественников эндотелиоцитов в процессе неоангиогенеза в миокарде при ХСН. Показано, что КМ-МНК способствуют усилению работы левого желудочка и региональной перфузии миокарда. Более того, интрамиокардиальное введение КМ-МНК, ведет к увеличению плотности капилляров, экспрессии мРНК фактора роста эндотелия сосудов и ангиопоэтина-2. О клинической эффективности интрамиокардиального введения аутологичных КМ-МНК сооб-

щается и в других работах [5]. Показано снижение функционального класса сердечной недостаточности и увеличения фракции выброса левого желудочка. Эффективность клеточной терапии зависит от популяционного состава и функциональной активности клеточного трансплантата. Функциональная активность клеточного трансплантата зависит от условий микроокружения в области пораженного миокарда [6—8]. Показано, что эритропоэтин повышает выживаемость клеток при гипоксии [9—10]. Так, инкубация костномозговых мононуклеарных клеток (КМ-МНК) подавляет апоптоз и стимулирует пролиферацию эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) [11]. Однако, как эритропоэтин влияет на субпопуляционный состав ЭПК, количество КМ-МНК, несущих рецептор к эритропоэтину у больных ХСН исследовано недостаточно.

Цель исследования — оценка эффекта кратковременной экспозиции КМ-МНК с эритропоэтином на количество клеток, экспрессирующих рецептор к эритропоэтину, параметры апоптоза и время пребывания клеток в фазах клеточного цикла, а также пролиферативный, миграционный и ангиогенный потенциал КМ-МНК.

Методика

В исследование включено 24 мужчины и 5 женщин в возрасте 45—74 лет, с ишемической болезнью сердца с функциональным классом сердечной недостаточности по NYHA II—III класса, давших информированное согласие на участие в исследовании. Аспират костного мозга забирали из подвздошной кости традиционным способом под местной анестезией. КМ-МНК выделяли из костного мозга на градиенте плотности фиколл/верографин ($\rho = 1,077$ г/л). Фенотип клеточного трансплантата до и после кратковременной экспозиции с эритропоэтином исследовали на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (BD, США) с использованием моноклональных антител, меченных FITC, PE или APC к CD31, CD34, CD45, CD131 и CD184 (BD, США), CD73, CD90, CD144 (BioLegend, США), CD105 (eBioscience, США), CD133 (Abcam, США), а также к рецептору эритропоэтина (EpoR, R&DS, США) и к рецептору 2 типа эндотелиального фактора роста (VEGFR-2/KDR, Novus Biologicals, США). Экспозицию КМ-МНК с эритропоэтином (Рекормон, Швейцария, 33,4 МЕ/мл) проводили в культуральных флаконах в физиологическом растворе с добавлением 10% аутологичной сыворотки в течение 40 мин при 37°C в CO₂-инкубаторе. Далее КМ-МНК трижды отмывали от остатков эритропоэтина и аутологичной сыворотки при 1500 об/мин в течение 5 мин.

В популяции CD34+ клеток исследовали клеточный цикл с использованием пропидиума иодида (BD, США) и апоптоз с использованием Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD, США). При анализе пребывания клеток CD34+ клеток в фазе клеточного цикла выделяли следующие фазы: subG0G1 (клетки с гиподиплоидным набором хромосом, $<2n$); G0G1 (клетки с диплоидным набором хромосом, фаза покоя/начального роста, $2n$); G2/M (клетки с гиперплоидным набором хромосом, фаза подготовки к митозу/митоз, $2n-4n$); S (клетки с гиперплоидным набором хромосом, фаза синтеза/репликации ДНК клеточного ядра, $>4n$). При анализе нахождения CD34+ клеток в апоптозе выделяли следующие гейты: некроз (мертвые клетки, окрашенные красителем для нуклеиновых кислот пропидиум иодидом), ранний апоптоз (клетки, имеющие нарушение «фосфолипидной асимметрии» мембраны и появление фосфатидилсерина на наружном слое мембраны, выявляемого взаимодействием с антикоагулянтом Annexin A), апоптоз (клетки позитивные на фосфатидилсерин и нуклеиновые кислоты).

Пролиферацию 2×10^5 КМ-МНК/лунку питательной среде DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки плода (FCS, Биолот, Россия), 2 mM L-глутамин (ICN, США) и 80 мкг/мл гентамицина (Дальхимфарм, Россия) далее посадочная среда, исследовали в спонтанном тесте и в ответ на стимулы (конканавалин А и фитогемагглютинин А в дозе 10 мкг/мл, липополисахарид в дозе 1 мкг/мл, рекормон в дозе 33,4 МЕ/мл, фактор роста эндотелия сосудов в дозе 10 нг/мл и перекись водорода в дозе 1, 3 и 5 mM, Sigma, США) по включению 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида (Sigma, США) на спектрофотометре Stat Fax 2100 (США). Кондиционную среду от КМ-МНК инкубированных без и в присутствии эритропоэтина собирали через 72 ч, центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин, разливали по аликвотам и хранили при -70°C.

Исследован эффект кондиционных сред от КМ-МНК на миграционный и пролиферативный потенциал клеток эндотелиальной линии EA.hy 929, любезно предоставленной Dr. C.J. Edgel (Университет Каролины, США). Клетки EA.hy 929 культивировали в питательной среде DMEM/F12 с добавлением 10% FCS, 2 mM L-глутамин, 80 мкг/мл гентамицина и НАТ (ICN, США), добавка к среде, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин, далее питательная среда для EA.hy929, в плоскодонных флаконах в концентрации $1,7 \times 10^5$ клеток/мл при 37°C во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂ до образования монослоя. Пролиферацию и миграцию EA.hy 929 исследовали в тесте «раневой повер-

хности», для этого EA.hy929 вносили в 24-луночные плоскодонные планшеты в питательной среде для EA.hy929. Через 24 ч по центру лунок наносили кончиком наконечника на 200 мкл рану, слущенные клетки удаляли двукратной промывкой лунок забуференным физиологическим раствором. В контроле вносили питательную среду для EA.hy 929. В опыте DMEM/F12 с добавлением 2 mM L-глутамин, 80 мкг/мл гентамицина и 30% кондиционной среды от КМ-МНК инкубированных без и в присутствии эритропоэтина. Через 3 и 24 ч инкубации при 37°C во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂ закрытие раневого дефекта оценивали на инвертированном микроскопе Zeiss (Zeiss, Германия). Ангиогенный потенциал EA.hy 929 под влиянием 30% кондиционной среды от КМ-МНК инкубированных без и в присутствии эритропоэтина или в питательной среде для EA.hy929 оценивали с использованием In Vitro Angiogenesis Assay Kit (Abcam, США) через 24 ч на инвертированном микроскопе Zeiss (Zeiss, Германия). Для этого в 96-луночный плоскодонный планшет вносят по 50 мкл Extracellular Matrix Solution, далее инкубируют при 37°C в течение 40 мин, далее вносят по 10⁴ клеток/лунку EA.hy 929 в контроле — питательная среда для EA.hy929, а в опыте — DMEM/F12 с добавлением 2 mM L-глутамин, 80 мкг/мл гентамицина и 30% кондиционной среды от КМ-МНК инкубированных без и в присутствии эритропоэтина. Через 24 ч инкубации при 37°C во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂ ангиогенный потенциал EA.hy 929 оценивали на инвертированном микроскопе Zeiss (Zeiss, Германия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0 for Windows (Stat Soft, США). Полученные данные проверяли на нормальность распределения согласно W-критерию Шапиро—Уилкса, меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (Lq) и верхним (Hq) квантилями; статистическую значимость рассчитывали по U-критерию Манна—Уитни и принимали при значениях $p \leq 0,05$. Связь между различными признаками определяли с помощью корреляционного анализа величиной коэффициента корреляции Спирмена (r).

Результаты и обсуждение

Среди КМ-МНК выделенных на градиенте плотности фиколл/верографин от больных ХСН можно выделить три основных типа стволовых клеток: гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), клетки предшественники эндотелиоцитов (ЭПК) и мезенхимные стволовые клетки (МСК) (табл. 1). Так, количество ГСК, несущих на своей мембране маркер CD45

(трансмембранный гликопротеин, член семейства протеин тирозин фосфатазы), у больных ХСН в среднем составило 1/3 от всех мононуклеарных клеток костного мозга. Важным свойством стволовых клеток костного мозга является их способность мигрировать из костного мозга на периферию, так называемый «хоуминг», а молекулой, вовлеченной в миграцию клеток к месту назначения, является CXCR-4, CXCR хемокиновый рецептор 4-го типа, специфический рецептор для CXCL хемокина SDF-1/CXCL12 (фузин, CD184) [12].

Количество ГСК, не несущих на своей мембране CD184 было в два раза больше, чем ГСК, несущих на своей мембране данную молекулу. Одним из эффектов эритропоэтина, опосредуемого через взаимодействие эритропоэтина с рецептором к нему, является увеличение выживаемости клеток в неблагоприятном микроокружении [13]. Поэтому нами исследовано наличие экспрессии рецептора к эритропоэтину на ГСК. В популяции ГСК большая часть клеток не несет на своей мембране данного рецептора.

ЭПК — это неоднородная популяция клеток костного мозга, несущая на своей мембране разнообразные молекулы, которые отражают динамику созревания и дифференцировки от менее зрелых форм к зрелым формам эндотелиоцитов. Одним из маркеров ЭПК является мембранный белок, обеспечивающий межклеточную адгезию стволовых клеток с внеклеточным матриксом костного мозга или со стромальными клетками, CD34.

Так, количество CD34+/CD45- клеток у больных ХСН не превышает 1% от общего пула КМ-МНК. В то же время, количество CD34+/CD45+ клеток свыше 6%. Среди пула ЭПК принято выделять «ранние» и «поздние» ЭПК, «незрелые» и «зрелые» ЭПК. О нахождении ЭПК на ранних стадиях дифференцировки судят по наличию экспрессии CD133 (проминин-1), гликопротеина, обеспечивающего топологию клеточной мембраны. У больных ХСН в костном мозге количество ранних ЭПК (CD34-/CD133+ клеток) больше поздних ЭПК (CD34+/CD133- клеток). О зрелости ЭПК судят по экспрессии CD31 и VEGFR-2. CD31 — это молекула адгезии тромбоцитов/эндотелиоцитов 1, гликопротеин суперсемейства иммуноглобулинов, вовлеченный в обеспечение адгезии клеток. VEGFR-2 — это рецептор тирозинкиназы III типа, опосредует эффект фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), а именно инициирует пролиферацию, выживание, миграцию, способность к формированию сосудоподобных структур и разрастанию эндотелиоцитов.

Количество зрелых форм ЭПК (CD34+/VEGFR-2+ и CD34+/CD31+ клеток)

в костном мозге больных ХСН также колеблется около 1%. Для миграции ЭПК из костного мозга на периферию необходимо наличие на клеточной мембране данных клеток «хоуминг-рецептора», так, нами показано, что количество CD34+ и CD31+ клеток, несущих на мембране CD184, сопоставимо. Кроме этого, нами изучена экспрессия на мембране CD34+ клеток, молекулы необходимой для адгезии к эндотелию — Кадгерин 5 2-го типа, контролирующей и организующей межклеточное соединение (CD144). Ко-

личество ЭПК у больных ХСН, несущих данную молекулу на мембране не превышает 0,3%. Также нами исследовано количество ЭПК, несущих на своей мембране рецептор к эритропоэтину. Показано, что количество CD34+/EpoR+ клеток в костном мозге больных ХСН меньше 0,3%. Классическими маркерами принадлежности клеток к мезенхимным стволовым клеткам являются CD90 (мембранный гликопротеин суперсемейства иммуноглобулинов, вовлечен в трансдукцию сигналов), CD73 (поверхност-

Таблица 1

Фенотипическая характеристика клеточного трансплантата больных ХСН

Фенотип	Количество (%)	Фенотип	Количество (%)
Гемопоэтические стволовые клетки		CD34+/CD184+	2,0 (0,97 — 3,35)
CD45+/CD34-	26,0 (26,0 — 44,16)	CD34-/CD184+	8,0 (2,85 — 19,85)
CD45+/CD184-	36,0 (24,56 — 36,0)	CD31+/CD184-	13,35 (8,0 — 20,0)
CD45+/CD184+	16,0 (5,4 — 17,7)	CD31+/CD184+	2,0 (2,0 — 7,45)
CD45+/EpoR-	11,5 (9,72 — 19,9)	CD31-/CD184+	2,0 (2,0 — 8,6)
CD45+/EpoR+	0,72 (0,39 — 1,0)	CD34+/EpoR-	11,0 (8,3 — 19,9)
Эндотелиальные прогениторные клетки		CD34+/EpoR+	0,67 (0,39 — 0,97)
CD34+/CD45+	2,61 (0,95 — 7,0)	CD34-/EpoR+	7,95 (0,1 — 12,0)
CD34+/CD45-	0,3 (0,2 — 0,6)	CD34+/CD131-	0,5 (0,1 — 0,7)
CD34-/CD133+	2,8 (0,9 — 14,4)	CD34+/CD131+	1,0 (0,2 — 2,3)
CD34+/CD133+	1,0 (0,6 — 1,15)	CD34-/CD131+	6,2 (4,1 — 8,8)
CD34+/CD133-	0,65 (0,1 — 1,0)	Мезенхимные стволовые клетки	
CD34-/VEGFR-2+	7,05 (2,6 — 20,65)	CD90+/CD73-	0,3 (0,1 — 0,3)
CD34+/VEGFR-2+	0,95 (0,67 — 1,85)	CD90+/CD73+	0,85 (0,35 — 2,05)
CD34+/VEGFR-2-	0,5 (0,05 — 4,0)	CD90-/CD73+	20,0 (11,73 — 23,6)
CD34-/CD31+	16,0 (10,0 — 28,4)	CD90+/CD105-	0,9 (0,3 — 1,0)
CD34+/CD31+	0,72 (0,39 — 1,0)	CD90+/CD105+	0,5 (0,35 — 0,99)
CD34+/CD31-	0,23 (0,1 — 10,0)	CD90-/CD105+	2,0 (1,9 — 4,1)
CD34-/CD144+	5,0 (5,0 — 5,0)	CD73+/CD105-	13,0 (5,5 — 20,6)
CD34+/CD144+	0,2 (0,2 — 0,2)	CD73+/CD105+	1,95 (1,07 — 5,8)
CD34+/CD144-	0,7 (0,7 — 0,7)	CD73-/CD105+	3,0 (0,9 — 4,2)
CD34+/CD184-	1,2 (0,46 — 4,0)		

Таблица 2

Клеточный цикл и уровень апоптоза CD34+ клеток у больных ХСН

Фазы клеточного цикла (%)	
subG0G1 (Апоптоз)	5,0 (5,0 — 5,0)
G0G1	78,0 (78,0 — 78,0)
G2/M	13,0 (13,0 — 13,0)
S	3,0 (3,0 — 3,0)
Параметры гибели клеток (%)	
Некроз (Annexin V-/PI+)	0,8 (0,32 — 1,05)
Ранний апоптоз (Annexin V+/PI-)	0,4 (0,1 — 3,05)
Апоптоз (Annexin V+/PI+)	5,35 (1,85 — 10,0)

но-клеточный протеин с энзимной и проводящей сигнал активностью) и CD105 (эндоглин, основной гликопротеин эндотелия сосудов человека, связывает различные белки TGF-β суперсемейства киназа рецепторного комплекса). У больных ХСН количество МСК в пуле КМ-МНК не превышало 3%.

О функциональной активности клеток костного мозга можно судить по пребыванию их в фазах клеточного цикла и уровню апоптоза (табл. 2).

Так, нами показано, что количество CD34+клеток КМ-МНК больных ХСН в 78% случаев находятся в фазе покоя/начального роста (G0G1), а в фазе синтеза и митоза — 18%, количество гиподиплоидных клеток не превышает 6%.

Более точную картину о количестве погибших и апоптотических клеток мы получили при исследовании апоптоза. Так, количество некротических клеток в популяции CD34+клеток КМ-МНК больных ХСН меньше 2%, клеток на ранней стадии апоптоза и поздней стадии апоптоза около 10%.

Кроме этого, нами показано, что КМ-МНК больных ХСН не отвечают на митогенный (Конканавалин А, Фитогемагглютинин А) и антигенный (Липополисахарид) стимулы (табл. 3).

В то же время, КМ-МНК больных ХСН проявляют тенденцию к увеличению пролиферации в ответ на фактор роста эндотелия сосудов и эритропоэтин.

Важной характеристикой клеточного трансплантата является устойчивость к действию неблагоприятных факторов микроокружения [14]. Поэтому, нами изучен пролиферативный потенциал КМ-МНК больных ХСН в условиях индукции окислительного стресса, вызываемого добавлением в питательную среду перекиси водорода. Так, нами показано, что при окислительном стрессе, индуцированного 1 мМ перекисью водорода, отмечается значимое увеличение пролиферативного потенциала КМ-МНК. В то же время, по мере возрастания концентрации перекиси

водорода в питательной среде отмечено значимое снижение пролиферативного потенциала КМ-МНК больных ХСН.

Корреляционный анализ полученных данных выявил наличие сопряженности между возрастом больных ХСН и количеством CD34+/CD133+, CD34-/CD31+, CD45+/EpoR- и CD34+/EpoR+ клеток ($r = +0,052, p \leq 0,05$; $r = +0,47, p \leq 0,05$; $r = +0,55, p \leq 0,05$ и $r = +0,49, p \leq 0,05$ соответственно). Количество ГСК и ЭПК, экспрессирующих рецептор к эритропоэтину находилось в обратной взаимосвязи с классом сердечной недостаточности по Нью-Йоркской классификации ($r = -0,49, p \leq 0,05$ и $r = -0,43, p \leq 0,05$ соответственно). Количество CD34+/CD45+ клеток в костном мозге больных ХСН взаимосвязано с количеством CD34+/CD184+, CD34+/CD133-, CD34+/KDR-, CD34+/CD31+, CD45-/EpoR+, CD34-/EpoR+ и CD31+/CD184- клеток ($r = +0,50, p \leq 0,05$; $r = +0,47, p \leq 0,05$; $r = +0,44, p \leq 0,05$; $r = +0,45, p \leq 0,05$; $r = +0,60, p \leq 0,05$; $r = +0,66, p \leq 0,05$ и $r = +0,67, p \leq 0,05$ соответственно). Кроме этого, количество CD34+/CD45+ клеток взаимосвязано с уровнем апоптоза ($r = +0,58, p \leq 0,05$ и $r = -0,56, p \leq 0,05$ соответственно subG0G1 и Annexin V+/Propidium iodid-). Количество ГСК, экспрессирующих или не экспрессирующих «хоуминг» рецептор (CD184, рецептор к SDF-1) сопряжено с количеством ЭПК, также экспрессирующих или нет CD184 до и после экспозиции с эритропоэтином. Так, количество CD45+/CD184- до инкубации с эритропоэтином взаимосвязано с количеством CD31+/CD184+ ($r = +0,52, p \leq 0,05$). Количество CD45+/CD184+ до инкубации с эритропоэтином находилось в обратной взаимосвязи с количеством CD31+/CD184+ и количеством CD31+/CD184- после инкубации с эритропоэтином ($r = -0,62, p \leq 0,05$ и $r = -0,36, p \leq 0,05$ соответственно). Между

Таблица 3

Проллиферативный потенциал клеток костного мозга больных ХСН

Проллиферация	Уровень пролиферации (ед. опт. пл.)
Спонтанная	0,66 (0,56 — 0,68)
Конканавалин А	0,57 (0,55 — 0,60) *
Фитогемагглютинин А	0,6 (0,6 — 0,67)
Липополисахарид	0,7 (0,66 — 0,7)
Фактор роста эндотелия сосудов	0,69 (0,64 — 0,7)
Эритропоэтин	0,7 (0,55 — 0,82)
1 мМ H ₂ O ₂	0,7 (0,58 — 0,76) *
3 мМ H ₂ O ₂	0,6 (0,51 — 0,64)
5 мМ H ₂ O ₂	0,57 (0,34 — 0,57) *

Примечание. $p \leq 0,05$ *по сравнению со спонтанной пролиферацией КМ-МНК

количеством CD34-/CD184+ и количеством CD31+/CD184+ в костном мозге больных ХСН установлена прямая сопряженность ($r = +0,50$, $p \leq 0,05$). Количество CD34-/CD133+ клеток в костном мозге больных ХСН взаимосвязано с количеством CD34-/KDR+ клеток ($r = +0,80$, $p \leq 0,05$). Количество CD34+/KDR+ клеток сопряжено с количеством CD34+/CD31- и с количеством CD34-/CD144+ клеток ($r = +0,42$, $p \leq 0,05$ и $r = -0,63$, $p \leq 0,05$ соответственно), а количество CD34+/KDR- клеток — с количеством CD34+/CD31- ($r = +0,72$, $p \leq 0,05$). Кроме этого, количество CD34+/KDR- клеток взаимосвязано с количеством в костном мозге больных ХСН CD31+/CD184+ и CD31-/CD184+ клеток ($r = -0,41$, $p \leq 0,05$ и $r = -0,57$, $p \leq 0,05$ соответственно). Между количеством в костном мозге больных ХСН CD34-/CD31+ клеток и количеством CD34+/EpoR-, CD34+/EpoR+, CD31+/CD184- и CD31+/CD184+ показана прямая взаимосвязь ($r = +0,61$, $p \leq 0,05$; $r = +0,49$, $p \leq 0,05$; $r = +0,45$, $p \leq 0,05$ и $r = +0,62$, $p \leq 0,05$ соответственно). В то же время, между количеством костномозговых клеток с фенотипом CD34+/CD31+ и количеством CD34+/EpoR+, CD31+/CD184+ клеток показана значимая взаимозависимость ($r = +0,74$, $p \leq 0,05$ и $r = +0,50$, $p \leq 0,05$ соответственно), а между количеством CD34+/CD31- клеток и количеством CD34-/EpoR+, CD31-/CD184+ клеток установлены следующие сопряженности ($r = +0,56$, $p \leq 0,05$ и $r = -0,43$, $p \leq 0,05$ соответственно). Необходимо отметить тот факт, что количество ГСК, экспрессирующих или нет рецептор к эритропоэтину взаимосвязано с количеством ЭПК, экспрессирующих или нет рецептор к эритропоэтину. В частности, количество CD45+/EpoR-клеток взаимосвязано с количеством CD34+/EpoR- клеток, а количество CD45+/EpoR+ клеток с количеством CD34+/EpoR+ клеток ($r = +0,66$, $p \leq 0,05$ и $r = +0,59$, $p \leq 0,05$ соответственно). Количество клеток костного мозга с фенотипом CD34+/EpoR+ клеток сопряжено с количеством CD31+/CD184- и CD31+/CD184+ клеток ($r = +0,45$, $p \leq 0,05$ и $r = +0,41$, $p \leq 0,05$ соответственно), а количество клеток с фенотипом CD34-/EpoR+ взаимосвязано с количеством CD31+/CD184- клеток ($r = +0,56$, $p \leq 0,05$).

Следующим этапом работы стала оценка эффекта кратковременной экспозиции КМ-МНК от больных ХСН с эритропоэтином.

В первую очередь был исследован эффект эритропоэтина на количество клеток ГСК и ЭПК экспрессирующих рецептор к эритропоэтину (табл. 4). Показано, что кратковременная экспозиция КМ-МНК

с эритропоэтином в дозе 33,4 МЕ/мл приводила к статистически значимому увеличению ГСК с фенотипом CD45+/EpoR+ по сравнению с исходным количеством.

В отношении изменения количества различных фенотипов ЭПК после воздействия эритропоэтина, установлено значимое снижение количества клеток с фенотипом CD34+/CD133+ и клеток с фенотипом CD34+/EpoR- по сравнению с исходным количеством ($p \leq 0,05$). Кроме этого, инкубация КМ-МНК с эритропоэтином способствует значимому увеличению пула клеток с фенотипом CD31-/CD184+, CD31+/CD184+ и CD34+/CD184- по сравнению с исходным количеством.

О функциональной активности клеток можно судить по параметрам клеточного цикла (табл. 5). Так, инкубация КМ-МНК больных ХСН привела к статистически значимому увеличению доли CD34+ клеток в фазе покоя/начального роста (G0G1) за счет уменьшения доли клеток в фазе подготовки к митозу/митоза (G2/M) и фазе синтеза/репликации (S). Кроме этого, эритропоэтин увеличивал количество апоптотических CD34+ клеток (subG0G1), согласно исследованию пребывания клеток, в фазах клеточного цикла.

В то же время, по данным оценки апоптоза с помощью Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, отмечена тенденция к возрастанию количества клеток с фенотипом CD34+ в гейтах характерных для некроза и апоптоза, и тенденция к уменьшению в гейте раннего апоптоза, но статистически незначимое.

Кратковременная инкубация КМ-МНК от больных ХСН приводила к значимому снижению пролиферативной активности клеток как в спонтанном тесте, так и при стимуляции их различными веществами (табл. 6).

Заключительным этапом исследования стала оценка эффекта секретируемых КМ-МНК биологически активных веществ в окружающую среду (цитокины, ростовые факторы) на функциональные свойства клеток EA.hy 929.

Добавление к питательной среде DMEM/F12 30% кондиционной среды от КМ-МНК больных ХСН, клеток, росших в присутствии или отсутствии эритропоэтина, способствует в достаточной мере обеспечению пролиферации и миграции от краев «раневого дефекта» в монослое клеток EA.hy 929 для успешного «закрытия» в обоих случаях. Наличие ангиогенных факторов в кондиционной среде от КМ-МНК больных ХСН подтверждается данными в тесте формирования сосудисто-подобных структур под влиянием 30% кондиционных сред от клеток, росших в присутствии или отсутствие эритропоэтина (табл. 7).

Таблица 4

Эффект эритропоэтина фенотип КМ-МНК от больных ХСН

Параметры	Количество клеток (%)	
	до	после
	кратковременной экспозиции с эритропоэтином	
Гемопоэтические стволовые клетки		
CD45+/EpoR+	0,72 (0,39 — 1,0)	4,95 (1,75 — 17,0) **
Эндотелиальные прогениторные клетки		
CD34-/CD31+	16,0 (10,0 — 28,4)	29,0 (9,3 — 29,0)
CD34+/CD31+	0,72 (0,39 -1,0)	1,0 (0,5 — 1,0)
CD34+/CD31-	0,23 (0,1 — 10,0)	1,7 (0,1 — 3,0)
CD34-/CD133+	2,8 (0,9 — 14,4)	0,54 (0,2 — 1,5)
CD34+/CD133+	1,0 (0,6 — 1,15)	0,7 (0,1 — 0,7) *
CD34+/CD133-	0,65 (0,1 — 1,0)	2,0 (0,01 — 6,0)
CD34-/KDR+	7,0 (2,6 — 20,65)	0,1 (0,03 — 0,3)
CD34+/KDR+	0,95 (0,67 — 1,85)	0,27 (0,1 — 2,5)
CD34+/KDR-	0,5 (0,04 — 4,0)	1,2 (0,01 — 2,4)
CD31-/CD184+	2,0 (2,0 — 8,6)	19,0 (3,1 — 19,0) **
CD31+/CD184+	2,0 (2,0 — 7,45)	10,0 (5,02 — 11,0) **
CD31+/CD184-	13,35 (8,0 — 20,0)	10,0 (7,08 — 12,8)
CD34-/CD184+	8,0 (2,85 — 19,85)	0,5 (0,1 — 3,0)
CD34+/CD184+	2,0 (0,97 — 3,35)	1,65 (0,4 — 2,0)
CD34+/CD184-	1,2 (0,46 — 4,0)	20,5 (15,95 — 26,95) *
CD34-/EpoR+	7,95 (0,1 — 12,0)	16,85 (7,45 — 25,0)
CD34+/EpoR+	0,67 (0,39 -0,97)	0,5 (0,35 — 0,65)
CD34+/EpoR-	11,05 (8,3 — 19,9)	1,0 (0,38 — 1,0) **
CD34-/CD131+	6,2 (4,1 — 8,8)	5,3 (2,9 — 27,8)
CD34+/CD131+	1,0 (0,2 — 2,3)	0,34 (0,2 — 1,7)
CD34+/CD131-	0,5 (0,1 — 0,7)	0,36 (0,04 — 0,6)

Примечание. p≤0,05 *по сравнению с исходным количеством клеток; p≤0,01 **по сравнению с исходным количеством клеток

Таблица 5

Влияние эритропоэтина на нахождение CD34+ клеток от больных ХСН в фазах клеточного цикла и апоптозе

Параметры	Количество клеток (%)	
	до	после
	кратковременной экспозиции с эритропоэтином	
Фазы клеточного цикла CD34+ клеток		
subG0G1 (апоптоз)	5,0 (5,0 — 5,0)	6,0 (6,0 — 6,0) *
G0G1	78,0 (78,0 -78,0)	85,0 (85,0 — 85,0) **
G2/M	13,0 (13,0 — 13,0)	7,0 (7,0 — 7,0) **
S	3,0 (3,0 — 3,0)	1,0 (1,0 — 1,0) **
Параметры гибели CD34+ клеток		
Некроз	0,8 (0,32 — 1,05)	0,95 (0,25 — 1,0)
Ранний апоптоз	5,35 (1,85 — 10,0)	4,0 (0,9 — 5,0)
Апоптоз	0,4 (0,1 — 3,05)	2,0 (0,5 — 2,05)

Примечание. p≤0,05 *по сравнению с исходным количеством клеток; p≤0,01 **по сравнению с исходным количеством клеток

Сердечная недостаточность занимает существенную долю в инвалидизации и смертности населения во всем мире [15]. Сердечная недостаточность после инфаркта миокарда, это следствие ремоделирования миокарда. Структурное ремоделирование миокарда ассоциируется с воспалительной реакцией, сопровождается формированием рубца в области инфаркта миокарда, а также изменениями в перинфарктной зоне миокарда, такими как интерстициальный фиброз и ремоделированием кровоснабжения миокарда [15]. Костный мозг содержит эндотелиальные клетки-предшественники и мезенхимные стволовые клетки, которые могут использоваться для клеточной терапии с целью увеличения постишемической неоваскуляризации миокарда [16]. Нами показано, что в костном мозге больных ХСН содержатся основные типы стволовых клеток, в том числе и ЭПК. Более того, в костном мозге больных ХСН содержатся ЭПК, находящиеся на разных стадиях созревания и дифференцировки. В частности, в костном мозге

больных ХСН в большом количестве содержатся ранние ЭПК, клетки, несущие на своей мембране только CD133 и являющиеся пулом для созревания более поздних ЭПК, несущих двойной маркер ЭПК CD34+/CD133+, что можно расценивать как сохранность костного мозга к выработке ЭПК. Кроме этого, в костном мозге больных ХСН выявляются ЭПК с высокой степенью зрелости, а именно CD34+/VEGFR-2+(KDR) и CD34+/CD31+, способные к репарации поврежденной стенки сосудов и к формированию новых сосудов. Более того, ЭПК несут на своей поверхности молекулы необходимые для осуществления «хоуминга» к месту востребованности (CD184) и адгезии к эндотелию сосудов (CD144), а также рецептор к эритропоэтину, что способствует увеличению выживаемости данного пула клеток на периферии в неблагоприятном микроокружении. Известно, что ЭПК характеризуются наличием на клеточной поверхности маркеров, таких как CD34, VEGFR-2. Именно ЭПК, несущие на своей

Таблица 6

Эффект эритропоэтина на пролиферативный потенциал КМ-МНК больных ХСН

Параметры	Количество клеток (%)	
	до	после
кратковременной экспозиции с эритропоэтином		
Проллиферативный потенциал КМ-МНК (ед. опт. пл.)		
Спонтанный	0,66 (0,56 — 0,68)	0,40 (0,40 — 0,45) ***
Конканавалин А	0,57 (0,55 — 0,60) *	0,36 (0,36 — 0,46) **
Фитогемагглютинин А	0,6 (0,6 — 0,67)	0,45 (0,37 — 0,46) ***
Липополисахарид	0,7 (0,66 -0,7)	0,50 (0,45 — 0,51) ***
Фактор роста эндотелия сосудов	0,69 (0,64 — 0,7)	0,39 (0,32 — 0,39) ***
Эритропоэтин	0,7 (0,55 — 0,82)	0,50 (0,49 — 0,54) ***
1 мМ Н ₂ О ₂	0,7 (0,58 — 0,76) *	0,36 (0,32 — 0,36) ***
3 мМ Н ₂ О ₂	0,6 (0,51 — 0,64)	0,40 (0,30 — 0,42) ***
5 мМ Н ₂ О ₂	0,57 (0,34 -0,57) *	0,38 (0,34 — 0,38) **

Примечание. p<0,05 *по сравнению со спонтанной пролиферацией КМ-МНК; p<0,05 **по сравнению с аналогичным параметром после инкубации КМ-МНК с эритропоэтином; p<0,01 ***по сравнению с аналогичным параметром после инкубации КМ-МНК с эритропоэтином

Таблица 7

Эффект кондиционных сред от КМ-МНК больных с ХСН на клетки EA.hy 929

Параметры	Кондиционная среда от КМ-МНК	
	без эритропоэтина	с эритропоэтином
Тест "раневого дефекта" (пролиферация и миграция клеток EA.hy 929)		
"закрытие раневого дефекта" через 24 ч (мкм)	60,7 (26,96 — 89,44)	50,52 (26,85 — 87,35)
Тест формирования сосудистоподобных структур клетками EA.hy 929		
Длина через 3 ч (мкм)	20,58 (17,77 — 23,35)	19,77 (18,25 — 22,9) *
Длина через 24 ч (мкм)	43,30 (34,96 — 45,91)	41,43 (35,21 — 49,46) *

Примечание. p<0,05 *по сравнению с 3-часовым значением

мембране CD34+/VEGFR-2+, являются независимым предиктором клинической эффективности при кардиоваскулярной патологии [17]. ЭПК это гетерогенная популяция клеток среди которых выделяют ранние и поздние ЭПК, отличающиеся по наличию на мембране CD144, VEGFR-2 [18]. Необходимо отметить тот факт, что в костном мозге больных ХСН также содержатся и МСК, которые способствуют формированию новых сосудов в ишемизированной ткани [19]. Полученный клеточный трансплантат от больных ХСН, характеризуется высокой пролиферативной активностью. Так, количество клеток в пуле CD34+ клеток ($14,85 \pm 1,75\%$) находится на стадии подготовки к митозу или же уже на стадии митоза. Высокая спонтанная пролиферация КМ-МНК также указывает на высокую пролиферативную активность клеточного трансплантата. Кроме этого, показано, что клеточный трансплантат устойчив к неблагоприятным факторам микроокружения, который был смоделирован *in vitro* добавлением к КМ-МНК перекиси водорода. Кроме этого, о высоком функциональном потенциале КМ-МНК больных ХСН можно судить и по малому проценту мертвых клеток ($1,4 \pm 0,46\%$) в пуле CD34+ клеток. Полученные нами результаты исследования эффекта preconditionирования КМ-МНК на количественный состав, нахождение в фазах клеточного цикла и параметры апоптоза, пролиферативный потенциал не противоречат исследованиям других исследователей. Известно, что рецепторы к эритропоэтину (EpoR), экспрессируются не только на эритроидных клетках, но и на других клетках, в том числе и ЭПК [7, 9]. Эритропоэтин взаимодействует с рецептором к нему, который существует в виде двух субъединиц или же в комбинации с CD131 (β -общее звено), через которые и осуществляется цитопротекторное действие эритропоэтина на клетки [7]. Так показано, что эритропоэтин в дозе 5 МЕ/мл стимулирует пролиферацию ЭПК, закрытие раневого дефекта монослоя ЭПК, миграцию и формирование сосудоподобных структур, повышает устойчивость ЭПК к действию окислительного стресса [7]. Об активации пролиферации и снижении уровня апоптоза, приживлении ЭПК сообщается в работе [20]. В работе авторов [21], показано, что до 40% клеток, мобилизованных на периферию из костного мозга введением гранулоцитарного-колониестимулирующего фактора, экспрессируют рецептор к эритропоэтину. В ответ на инкубацию с 10 МЕ/мл таких клеток показано увеличение уровней экспрессии васкулогенных факторов (IL8, IL10, bFGF, PDGF, MMP9) и молекул адгезии (интегринов α V, β 1, β 2, β 8). Полученные нами данные об активации пролиферативного и миграционного потенциала EA.hy 929 в присутствии конди-

ционной среды от КМ-МНК согласуются с данными авторов [22], показавших усиление регенерации эндотелия трахеи, поврежденной химическим ожогом, в ответ на кондиционную среду от мезенхимных стволовых клеток.

Заключение

Таким образом, клеточный трансплантат от больных ХСН характеризуется наличием в нем гемопоэтических стволовых клеток, эндотелиальных прогениторных клеток, находящихся на разных стадиях созревания и дифференцировки, а также мезенхимных стволовых клеток, с высоким пролиферативным потенциалом и устойчивостью к окислительному стрессу, продукцией биологически активных веществ, способствующих пролиферации, миграции и формированию сосудистоподобных структур клеточной линией зрелых эндотелиоцитов, что позволяет использовать их для клеточной терапии.

References

1. Moiseeva OM, Karelkina EV, Moroshkin VS, Selyutin AV, Shlyakhto EV. The Study of Circulating Endothelial Precursor Cells in Patients With Chronic Heart Failure. *Kardiologiya*. (Cardiology Russian Journal). 2011; 12: 36-42. (in Russian)
2. Kochegura TN, Efimenko AY, Akopyan ZhA, Parfenova EV. Stem cell therapy of heart failure: clinical trial, problems and perspectives. *Geny I kletki*. (Gen and cells Russian Journal). 2010; 2: 11-8. (in Russian)
3. Seurder D, Radrizzani M, Turchetto L, Lo Cicero V, Soncin S, Muzzarelli S, Auricchio A, Moccetti T. Combined Delivery of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells in Chronic Ischemic Heart Disease: Rationale and Study Design. *Clin Cardiol*. 2013; 36(8): 435-41.
4. Tse H-F, Siu C-W, Zhu S-G, Songyan L, Zhang Q-Y, Lai W-H, Kwong Y-L, Nicholls J, Lau C-P. Paracrine effects of direct intramyocardial implantation of bone marrow derived cells to enhance neovascularization in chronic ischemic myocardium. *Eur J Heart Failure*. 2007; 9: 747-53.
5. Pokushalov E, Romanov A, Chernyavsky A, Lariov P, Terekhov I, Artyomenko S, Poveshenko O, Kliver E, Shirokova N, Karaskov A, Dib N. Efficiency of intramyocardial injections of autologous bone marrow mononuclear cells in patients with ischemic heart failure: a randomized study. *J Cardiovasc Transl Res*. 2010; 3(2): 160-68.
6. Lykov AP, Bondarenko NA, Sakhno LV, Shevela EY, Poveshenko OV, Kim II, Nikonorova YV, Konenkov VI. The impact of secretory factors endothelial cells on the functional activity of human multipotent mesenchymal stromal cells. *Fundamental'nye issledovaniya*. (Fundamental research Russian Journal). 2014; 4(2): 296-301. (in Russian)
7. Bennis Y, Sarlon-Bartoli G, Guillet B, Lucas L, Pellegrini L, Velly L, Blot-Chabaud M, Dignat-Georges F, Sabatier F, Pisano P. Priming of late endothelial progenitor cells with erythropoietin before transplantation requires the CD131 receptor subunit and enhances their angiogenic potential. *J Thromb Haemost*. 2012; 10(9): 1914-28.
8. Kandala J, Upadhyay GA, Pokushalov E, Wu S, Drachman DE, Singh JP. Meta-analysis of stem cell therapy in

chronic ischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2013; 112(2): 217-25.

9. Osikov MV, Akhmatov VY, Telesheva LF, Fedosov AA, Ageev YI, Surovyatkina LG. Pleiotropic effects of erythropoietin in chronic renal failure. *Fundamental'nye issledovaniya.* (Fundamental research Russian Journal) 2013; 7(1): 218-24. (in Russian)

10. Nepomnyashchikh LM, Lushnikova EL, Larionov PM, Shurygin MG. Myocardial regeneration: proliferative potential of cardiomyocytes and induction of cardiomyogenesis at alternative and plastic cardiac failure. *Annals of the Russian academy of medical sciences.* 2010; 5: 3-11. (in Russian)

11. Hristov M, Zernecke A, Bidzhekov K, Liehn EA, Shagdarsuren E, Ludwig A, Weber C. Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury. *Circ Res.* 2007; 100(4): 590-7.

12. Colombo E, Marconi C, Taddeo A, Cappelletti M, Villa ML, Marzorati M, Porcelli S, Vezzoli A., Bella SD. Fast reduction of peripheral blood endothelial progenitor cells in healthy human exposed to acute systemic hypoxia. *J Physiol.* 2012; 590(3): 519-32.

13. Zakharov YuM. Citoprotective effects of erythropoietin. *Klinicheskaya nefrologiya.* (Clinical Nephrology Russian Journal). 2009; 1: 16-21. (in Russian)

14. Kiani AA, Kazemi A, Halabian R, Mohammadipour M, Jahanian-Najafabadi A, Roudkenar MH. HIF-1 α confers resistance to induced stress in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Arch Med Res.* 2013; 44(3): 185-93.

15. Parkn J-H, Yoon JY, Ko SM, Jin SA, Kim JH, Cho C-H, Kim J-M, Lee J-H, Choi SW, Seong I-W, Jeong J-O. Endothelial progenitor cell transplantation decreases lymphangiogenesis and adverse myocardial remodeling in

a mouse model of acute myocardial infarction. *Exp Mol Med.* 2011; 43(8): 479-85.

16. Wang QR, Wang BH, Zhu WB, Huang YH, Li Y, Yan Q. An in vitro study of differentiation of hematopoietic cells to endothelial cells. *Bone Marrow Res.* 2011; 2011: 846096. DOI:10.1155/2011/846096.

17. Ahmed SH, Sabry D, Noh O, Samir M. Potential proliferative effect of lipopolysaccharide preconditioning on human umbilical blood-derived endothelial cells. *Afr J Biotechnol.* 2015; 14(13): 1167-73.

18. Hur J, Yoon C-H, Kim H-S, Choi J-H, Kang H-J, Hwang K-K, Oh B-H, Lee M-M, Park Y-B. Characterization of Two Types of Endothelial Progenitor Cells and Their Different Contributions to Neovascularogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 288-93.

19. Roubelakis MG, Tsaknakis G, Pappa KI, Anagnostou NP, Watt SM. Spindel shaped human mesenchymal stem/stromal cells from amniotic fluid promote neovascularization. *PLoS One.* 2013; 8(1). E.54747. DOI: 10.1371/journal.pone.0054747.

20. Hu R, Cheng Y, Jing H, Wu H. Erythropoietin promotes the protective properties of transplanted endothelial progenitor cells against acute lung injury via PI3K/Akt pathway. *Shock.* 2014; 42(4): 327-36.

21. Kang J, Yun JY, Hur J, Kang JA, Choi JI, Ko SB, Lee J, Kim JY, Hwang IC, Park YB, Kim HS. Erythropoietin priming improves the vasculogenic potential of G-CSF mobilized human peripheral blood mononuclear cells. *Cardiovasc Res.* 2014; 104(1): 171-82.

22. Temnov A.A., Volkova A.G., Melerzanov A.V., Novoselov V.I. Effect of conditioned medium from mesenchymal stem cells on regeneration of endothelium of HCl-induced damage trachea in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya.* 2017; 61(2): 28-36. (in Russian)

Сведения об авторах:

Чернявский Александр Михайлович, доктор мед. наук, руководитель Центра хирургии аорты, коронарных и периферических артерий «СФБИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, e-mail: amchern@mail.ru

Повешенко Ольга Владимировна, доктор мед. наук, зав. лаб. клеточных технологий НИИКЭЛ-филиал ИЦиГ СО РАН, зав. лаб. клеточных технологий Центра новых технологий «СФБИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, e-mail: poveshchenkoov@yandex.ru;

Фомичев Алексей Вячеславович, канд. мед. наук, науч. сотр. Центра хирургии аорты, коронарных и периферических артерий «СФБИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, e-mail: a_fomichev@list.ru

Суровцева Мария Александровна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. клеточных технологий НИИКЭЛ-филиал ИЦиГ СО РАН, ст. науч. сотр. лаб. клеточных технологий Центра новых технологий «СФБИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, e-mail: mfelde@ngs.ru

Бондаренко Наталья Анатольевна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. клеточных технологий НИИКЭЛ-филиал ИЦиГ СО РАН, ст. науч. сотр. лаб. клеточных технологий Центра новых технологий «СФБИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, e-mail: bond80288@yandex.ru

Ким Ирина Иннокентьевна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. клеточных технологий НИИКЭЛ-филиал ИЦиГ СО РАН, мл. науч. сотр. лаб. клеточных технологий Центра новых технологий «СФБИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, e-mail: ki15@mail.ru

Карева Юлия Евгеньевна, канд. мед. наук, врач-сердечно-сосудистый хирург, науч. сотр. Центра хирургии аорты, коронарных и периферических артерий «СФБИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, e-mail: julia11108@mail.ru

Таркова Александра Романовна, аспирант Центра хирургии аорты, коронарных и периферических артерий «СФБИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России Ф, e-mail: artarkova@mail.ru

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-001.28

Дешевой Ю.Б., Мороз Б.Б., Насонова Т.А., Лебедев В.Г., Добрынина О.А., Лырщикова А.В.

Влияние культивированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани на восстановление кожи при местных лучевых поражениях

ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна»
ФМБА России, 123182, г. Москва, Россия, ул. Живописная, д. 46

Цель — изучение лечебной эффективности сингенных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) при тяжелых лучевых поражениях кожи. **Методы.** Эксперименты проводили на крысах инбредной линии Wistar-Kyoto. Локальное облучение в дозе 110 Гр (напряжение на трубке 30 кВ, ток 6,1 мА, фильтр Al толщиной 0,1 мм) выполняли на рентгеновской установке. Мощность дозы — 17,34 Гр/мин. Площадь облучения — 8,5 см². Такое радиационное воздействие позволяло получать тяжелые лучевые поражения кожи с длительно (до 3,5 мес.) не заживающими язвами. ММСК выделяли из подкожной жировой ткани интактных животных с помощью коллагеназы и затем культивировали их *in vitro*. ММСК вводили (1,6—1,8 × 10⁶ клеток на одну инъекцию) под кожу вокруг лучевых язв. Тяжесть лучевого поражения кожи и эффекты клеточной терапии оценивали в динамике по клиническим проявлениям, с помощью планиметрии и патоморфологических методов. **Результаты.** Установлено, что введение культивированных сингенных ММСК дважды через 27 и 34 сут. или через 34 и 42 сут. после локального облучения, способствует усилению регенераторных процессов в пораженной ткани, что проявлялось более быстрым заживлением лучевых язв у леченых животных по сравнению с облученным контролем. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что трансплантированные аутологичные ММСК, полученные из жировой ткани, могут быть эффективны при лечении длительно незаживающих лучевых язв.

Ключевые слова: клеточная терапия; мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; жировая ткань; рентгеновское излучение; лучевые язвы кожи.

Для цитирования: Дешевой Ю.Б., Мороз Б.Б., Насонова Т.А., Лебедев В.Г., Добрынина О.А., Лырщикова А.В. Влияние культивированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани на восстановление кожи при местных лучевых поражениях. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(4): 62—66. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8524

Для корреспонденции: Дешевой Юрий Борисович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр., центр биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна, ФМБА России, e-mail: iury.deshevoi@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.03.2017

Deshevoy Yu.B., Moroz B.B., Nasonova T.A., Lebedev V.G., Dobrynina O.A., Lirshnikova A.V.

Effect of cultivated multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue to restore skin with local radiation lesions

A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, 46, Zhivopisnaya str., Moscow, 123182, Russia

The purpose. Study of the therapeutic effectiveness of syngeneic mesenchymal stem cells (MMSK) with heavy radiation skin lesions. **Methods.** Experiments conducted on rats Wistar-Kyoto inbred. Local irradiation dose of 110 Gy (voltage on the tube 30 kV, current 6.1 Ma, filter 0.1 mm thick Al) served through an x-ray machine. Dose rate is 17.34 Gy/min. Area field irradiation was 8.5 cm². Radiative forcing is allowed to receive severe radiation damage of the skin with long (up to 3.5 months) did not heal ulcers. MMSK singled out of the subcutaneous adipose tissue intact animals using collagenase and then cultivated *in vitro*. MMSK injected (1.6—1.8 × 10⁶ cells per injection) under the skin around the radiation ulcers. The severity of radiation injury to the skin and the effects of cell therapy were evaluated in the dynamics of clinical manifestations, using planar geometry and pathomorphological methods. **Results.** It has been established that the introduction of cultivated syngeneic MMSK, investigated through 27 and 34 days or twice through 34 and 42 days after local irradiation enhances regenerative processes in the affected tissue, which showed faster healing Ray treated ulcers in animals compared to the irradiated control. **Conclusion.** The results showed that the transplanted autologous MMSK derived from adipose tissue, can be effective in the treatment of long-term healing of radiation ulcers.

Key words: cellular therapy; multipotent mesenchymal stromal cells; adipose tissue; X-ray; radiation skin ulcers.

For citation: Deshevoy Yu.B., Moroz B.B., Nasonova T.A., Lebedev V.G., Dobrynina O.A., Lirhshikova A.V. Effect of cultivated multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue to restore skin with local radiation lesions. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(4): 62—66. (in Russian). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8524

For correspondence: Yuri B. Deshevoy, Candidate of Medical Sciences, Leading Researcher A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, 46, Zhivopisnaya str., Moscow, 123182, Russia Federation, e-mail: iury.deshevoi@yandex.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Deshevoi Yu.B., <http://orcid.org/0000-0003-2755-5674>

Moroz B.B., <http://orcid.org/0000-0002-9982-723X>

Nasonova T.A., <http://orcid.org/0000-0003-1511-4329>

Received 18.03.2017

Введение

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), выделенные из костного мозга, способны замещать и восстанавливать структуру и функции поврежденных тканей и могут использоваться для клеточной терапии различных заболеваний [1, 2]. Существует 3 основных источника для выделения ММСК у человека: костный мозг, подкожная жировая ткань и пуповинная кровь. Показана близость функциональных свойств ММСК, полученных из различных тканей [3]. Тем не менее, в настоящее время жировая ткань у человека является предпочтительным источником получения ММСК для клеточной терапии. Это обусловлено тем, что в подкожной жировой ткани концентрация ММСК гораздо выше, чем в других тканях [4]. Жировую ткань просто получать в больших количествах в клинических условиях и процедура ее выделения безопасна. Обработка выделенного жира коллагеназой с дальнейшим центрифугированием позволяет быстро получить клетки стромальной васкулярной фракции жировой ткани (СВКФ). Стромальная васкулярная фракция жировой ткани является сложным клеточным комплексом, содержащим стволовые клетки, эндотелиальные и гладкомышечные клетки кровеносных сосудов и их предшественники, перидциты, фибробласты и клетки крови [4, 5]. СВКФ служат источником для выделения ММСК жировой ткани.

Тяжелые лучевые поражения кожи очень трудно поддаются лечению и склонны к хроническому течению с серьезными осложнениями [6]. Методы клеточной терапии могут быть эффективны при терапии данной патологии [7, 8]. Трансплантированные ММСК жировой ткани оказывают существенное влияние на репаративные процессы в поврежденных тканях. Информация о свойствах, выделенных из жи-

ровой ткани ММСК, их идентификации, перспективах клинического использования для тканевой инженерии и в регенерационной медицине представлена в ряде обзоров [4, 5, 9]. Имеются единичные наблюдения об эффективности стволовых клеток жировой ткани при лечении лучевых ожогов кожи [10—12].

Целью работы является изучение возможности применения ММСК, выделенных из жировой ткани и культивированных *in vitro*, для совершенствования метода клеточной терапии тяжелых лучевых поражений кожи.

Методика

Исследования были проведены на крысах, самцах инбредной линии Wistar-Kyoto массой 200—220 г, полученных из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (г. Пушкино). Использование инбредных животных позволяет проводить трансплантации ММСК в сингенной системе (без отторжения пересаженных клеток). 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.

Предварительно фиксированных крыс облучали локально в области спины на рентгеновской установке РАП 100 — 10 в дозе 110 Гр (напряжение на трубке 30 кВ, ток 6,1 мА, фильтр Al толщиной 0,1 мм). Мощность дозы — 17,34 Гр/мин. Такое радиационное воздействие позволяло получать тяжелые лучевые поражения кожи с длительно (до 3,5 мес.) не заживающими язвами [13].

Забор подкожной жировой ткани методом операционной липоэктомии из брюшной и паховых областей проводили у наркотизированных (золетил, в/бр в дозе

10 мг/кг) интактных крыс [14], которые не использовались в дальнейших экспериментах. Выделение СВКФ жировой ткани выполняли посредством использования коллагеназы IА для растворения коллагеновых волокон и освобождения клеток из предварительно размельченной жировой ткани. После центрифугирования и отмывки от фермента получали очищенную СВКФ [15, 16]. Далее клетки сразу после их выделения суспендировали в культуральной среде Iscov'MDM + GlutaMax + Neres (Sigma, США), содержащей 15% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота («HyClone», США), гентамицин 50,0 мг/л, амфотерицин Б 2,5 мг/л и высаживали в культуральные пластиковые флаконы для получения ММСК и наработки этих клеток *in vitro* [16]. Культивирование проводили в CO₂ инкубаторе (Sanyo, Япония). Клетки формировали на дне флакона монослой и имели фибробластоподобную морфологию. Характеристика клеточной культуры, проведенная методом непрямой иммунофлуоресценции, показала, что в 100% клеток выявлялся виментин — белок цитоплазматического скелета стромальных клеток,

коллаген I типа и коллаген III типа — белок межклеточного матрикса, синтезируемый ММСК различного уровня дифференцировки. Для клеточной терапии использовали ММСК второго пассажа. Перед трансплантацией клетки отслаивали со дна флакона (трипсин-ЭДТА), отмывали от фермента, подсчитывали и далее разводили стерильным раствором Хенкса до необходимой концентрации. Суспензию ММСК в 1 мл раствора вводили под кожу в 5 точек (по 0,2 мл на точку) вокруг лучевой язвы, отступив 2—3 мм от края очага.

Трансплантацию ММСК проводили в 2 отдельных экспериментах в период, когда в сформировавшейся лучевой язве должны активизироваться процессы, приводящие к восстановлению облученной ткани. В 1-м опыте — крысам (17 особей) трансплантировали ММСК дважды — через 27 (в дозе $1,8 \times 10^6$ клеток на животное) и 34 сут. (в дозе $1,6 \times 10^6$ клеток на животное) после облучения. Во 2-м опыте ММСК (9 животных) вводили дважды в тех же количествах, но через 34 и 42 сут. Контроль (облученные животные без лечения) составили: в 1-м опыте — 17, во 2-м — 9 крыс. Наблюдение за животными проводили в течение 100—105 сут. после воздействия радиации.

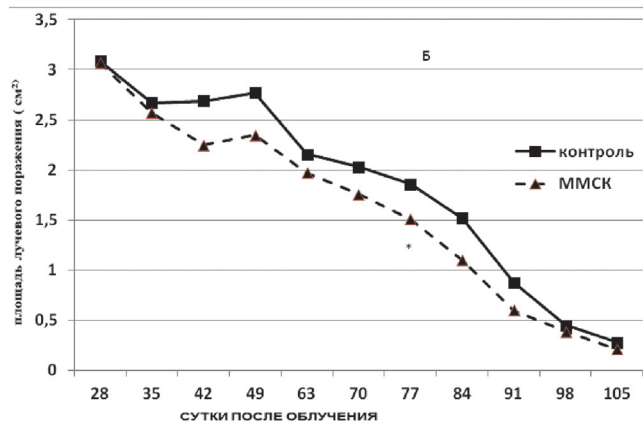
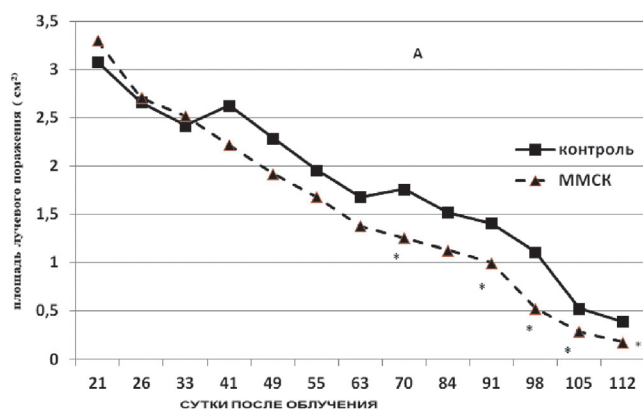
Тяжесть течения лучевого поражения и эффективность клеточной терапии оценивали в динамике по изменению клинической картины и площади пораженного участка кожи, определяемого методом планиметрии. Для этого производили фотосъемку лучевой язвы цифровой фотокамерой Canon и рассчитывали площадь поражения кожи с помощью компьютерной программы AutoCad 14.

Полученный цифровой материал обрабатывался методом вариационной статистики. Статистическую значимость различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В начальный период после облучения клиническая картина поражения кожи у всех животных была примерно одинакова. Так, на 8-е — 11-е сут. у крыс в области поражения наблюдались симптомы сухого дерматита. К 14-м — 16-м сут. появилась экссудация и сухой дерматит переходил во влажный. Через 21—25 сут. после радиационного воздействия на коже крыс образовывались язвы, покрытые струпом коричневого цвета. Далее происходило либо постепенное заживление язв с образованием атрофического рубца, либо патологический процесс приобретал хроническое течение.

На рисунке (А, Б) представлены данные изменения площади поражения кожи у разных групп живот-



Динамика заживления лучевых язв кожи у крыс после локального облучения в условиях трансплантации ММСК жировой ткани. А — трансплантация ММСК через 27 и 34 сут.; Б — введение ММСК через 34 и 42 сут. * — статистически значимые различия по сравнению с облученным контролем ($p < 0,05$).

ных после облучения. Результаты показывают, что введение ММСК через 27 и 34 сут. после локального облучения способствует активизации регенераторных процессов в облученной ткани, что проявилось в ускорении заживления лучевых язв. Так, начиная с 42-х сут. после воздействия радиации, площадь лучевых язв у леченных животных была на 15—52% меньше, по сравнению с облученным контролем. Второй эксперимент с отсроченным на 1 нед. введением ММСК показал несколько меньшую эффективность — площади лучевой язвы у леченных животных были меньше на 9—32% по сравнению с облученным контролем.

Наши результаты близки к данным, опубликованным в обзорной статье [17], где эффективность применения ММСК при лечении вялотекущих язв кожи (не лучевой этиологии) у животных была менее выражена — скорость заживления ран после трансплантации повышалась не более чем на 20—35% по сравнению с контролем. Можно предположить, что в условиях комплексной терапии эффективность применения ММСК будет возрастать.

Реализация лечебного действия трансплантированных клеток зависит от многих факторов: от исходного статуса клетки и потенциала дальнейшей её дифференцировки; способности клетки секретировать цитокины и факторы роста; необходимости приживания и дальнейшего выживания клеток для достижения желаемого результата, способности введенных клеток заменять погибшие и поврежденные клетки, стимулировать эндогенные механизмы репарации и регенерации, а также от миграционных способностей клеток.

Лечебный эффект от введения аутологичных или сингенных ММСК под кожу вокруг лучевой язвы может быть связан с тем, что ММСК выживают после трансплантации и длительно остаются в зоне близкой к пораженному участку кожи [12, 18—20]. Судьба этих клеток не совсем понятна. Могут ли они пролиферировать? Как длительно сохраняется их функциональная активность? Способны ли они к дифференцировке или трансдифференцировке?

Считается, что пересаженные в кожу ММСК могут дифференцироваться там в конечном счете в фибробласты и жировые клетки. Предполагается, что лечебный эффект ММСК все таки в большей степени связан с их паракринным действием: выработкой различных факторов роста, усилением неоангиогенеза, снижением местной воспалительной реакции [5, 9, 18, 20, 21].

Таким образом, трансплантированные аутологичные ММСК могут быть эффективны при лечении длительно незаживающих лучевых язв за счет стимулирующего их действия на регенераторные процессы в облученной ткани.

References

1. Tuan R.S., Boland G., Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res. Ther.* 2003; 5(1): 32-45.
2. Phinney D.G., Prockop D.J. Concise review. Mesenchymal stem cells/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair — current views. *Stem Cells.* 2007; 25(11): 2896-902.
3. Kern S., Eichler H., Stoeve J., Kluter H., Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells.* 2006; 24(5): 1294-301.
4. Bourin P., Bunnell B.A., Casteilla L., Dominici M., Katz A.J., March K.L. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and cultured expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for adipose therapeutics and the International Society for cellular therapy (ISCT). *Cytotherapy.* 2013; 15: 641-8.
5. Terskikh V.V., Kiseleva E.V. Biological peculiarities and therapeutic potential of stromal cells of adipose tissue. Review. *Plasticheskaya hirurgiya i kosmetologiya.* 2010; 4: 613-21. (in Russian)
6. Bushmanov A.J., Nadejina N.M., Nugis V.Yu., Galshtyan I.A. Local radiation damage of human skin: possible biological indication of dose (analytical review). *Medicinskaya radiologiya i radiacionnaya bezopasnost.* 2005; 50 (1): 37-47. (in Russian)
7. Moroz B.B., Onischenko N.A., Lebedev V.G., Deshevoi Yu.B., Nasonova T.A., Dobrynina O.A., Lyschikova A.V. Influence of multipotent mesenchymal stromal cells of bone marrow on process the local radiation injury in rats after local β -irradiation. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya.* 2009; 49 (6): 688-93. (in Russian)
8. Kotenko K.V., Moroz B.B., Nadejina N.M., Deshevoi Yu.B., Nasonova T.A., Dobrynina O.A., Lyschikova A.V. Mesenchymal stem cells transplantation in the treatment of radiation skin lesions. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya.* 2011; 55(1): 2-7. (in Russian)
9. Gimble J.M., Guilak F., Bunnell B. Clinical and pre-clinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Research & Therapy.* 2010; 1: 19.
10. Rigotti G., Marchi A., Galie M., Baroni G., Krampera M., Pasini A. et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose tissue-derived adult stem cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 2007; 119(5): 1409-22.
11. Riccodono D., Agay D., Scherthan H. Application adipose-derived stem cells in treatment of cutaneous radiation syndrome. *Health Phys.* 2012; 103(2): 120-6.
12. Sheng-Ping Huang, Chun-Hsiang Huang, Jia-Fwu Shyu, Heng-Sheng Lee. Promotion of wound healing using adipose-derived stem cells in radiation ulcer of a rat model. *Journal of Biomedical Science.* 2013; 20(1): 51-61.
13. Kotenko K.V., Moroz B.B., Nasonova T.A., Dobrynina O.A., Lipengolz A.A., Gimadova T.I. et al. Experimental model of severe local radiation injuries of the skin after x-rays. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya.* 2013; 57(4): 121-3. (in Russian)
14. Gregoire F., Todoroff G., Haiser N. The stroma-vascular fraction of rat inguinal and epididymal adipose tissue and the adipogenesis of fat cell precursors in primary culture. *Biol. Cell.* 1990; 69: 215-22.

15. Aronowitz J.A., Ellenhorn J.D.I. Adipose stromal vascular fraction isolation: four commercial cell separation systems. *Plast. Reconstr. Surg.* 2013; 132(6): 932 -9.
16. Bunnell B.A., Flaat M., Gagliardi Ch. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods.* 2008; 45(2): 115-20.
17. Brower J., Blumberg Sh., Carroll E. Mesenchymal stem cells therapy and delivery systems in nonhealing wounds. *Advances in skin & World care.* 2011; 24(11): 524-32.
18. Yaojiong Wu M.D., Liwen Cheng, Paul G. Scott. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem cells.* 2007; 25(10): 2648-59.
19. Lopez-Iglesias P., Blazquez-Martinez A., Fernandez-Delgado J. Short and long fate of human AMSC subcutaneously injected in mice. *World journal of stem cells.* 2011; 3(6): 53-62.
20. Ju-Won Kim, Jong-Hwan Lee, Yong S. Lyoo, Dong-In Jung, Hee-Myung Park. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. *Veterinary dermatology.* 2013; 24(2): 242-53.
21. Kim W.S., Park B.S., Sung J.H. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* 2007; 48(1): 15-24.

Сведения об авторах:

Мороз Борис Борисович, доктор мед. наук, проф., академик РАН, зав. лаб. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

Насонова Тамара Алексеевна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

Лебедев Владимир Георгиевич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, e-mail: vgleb468@yandex.ru

Добрынина Ольга Александровна, науч. сотр. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

Лырщикова Алла Васильевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092

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

Программирование противоопухолевого иммунного ответа *in vitro* и его использование для остановки пролиферации опухолевых клеток и увеличения продолжительности жизни мышей с карциномой *in vivo*

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

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

Цель — представить доказательства правомерности гипотезы, что комбинированный пул репрограммированных *in vitro* макрофагов и лимфоцитов будет эффективно ограничивать пролиферацию опухолевых клеток *in vitro*, а при введении в организм будет существенно ограничивать развитие опухоли *in vivo*. **Методика.** Размножение опухолевых клеток инициировали *in vitro* путем добавления клеток карциномы Эрлиха (КЭ) в среду культивирования RPMI-1640. Развитие асцитной опухоли *in vivo* воспроизводили путем внутрибрюшной инъекции клеток КЭ мышам. **Результаты.** Установлено, что M3-STAT3/6-SMAD3 макрофаги вместе с антиген-репрограммированными лимфоцитами оказывают выраженный противоопухолевый эффект и *in vitro*, и *in vivo*, который был существенно выше противоопухолевого эффекта цисплатина. **Заключение.** Факты, свидетельствующие, что M3 макрофаги в сочетании с *in vitro* антиген-репрограммированными лимфоцитами значительно подавляют рост опухоли *in vivo*, делают перспективным разработку клинической версии биотехнологии ограничения роста опухоли путем предварительного программирования противоопухолевого иммунного ответа «в пробирке».

Ключевые слова: макрофаги, лимфоциты, карцинома, репрограммирование, иммунный ответ.

Для цитирования: Калиш С.В., Лямина С.В., Раецкая А.А., Малышев И.Ю. Программирование противоопухолевого иммунного ответа *in vitro* и его использование для остановки пролиферации опухолевых клеток и увеличения продолжительности жизни мышей с карциномой *in vivo*. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 67–73. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8525

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

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.05.2017

Kalish S.V.¹, Lyamina S.V.¹, Raetskaya A.A.¹, Budanova O.P.², Malyshev I.Yu.^{1,2}

Programming the anti-tumor immune response *in vitro* and its application to stop the growth of tumor cells and prolonging the lifespan of mice with carcinoma *in vivo*

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

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

Aim. To test a hypothesis that a combined pool of *in vitro* reprogrammed macrophages and lymphocytes will effectively limit growth of tumor cells *in vitro*, and injections of these cells into the body will considerably limit development of a tumor *in vivo*. **Methods.** Tumor growth was initiated *in vitro* by addition of Ehrlich carcinoma (EC) cells to the RPMI-1640 cell culture medium and *in vivo* by intraperitoneal injection of EC cells into mice. **Results.** M3-STAT3/6-SMAD3 macrophages in combination with antigen-reprogrammed lymphocytes exerted a pronounced antitumor effect both *in vitro* and *in vivo*, which was superior to the effect of cisplatin. **Conclusion.** M3 macrophages in combination with *in vitro* antigen-reprogrammed lymphocytes significantly inhibited the tumor growth *in vivo*. This fact justifies development of a clinical version of the tumor

growth restricting biotechnology using pre-programming of the antitumor immune response *in vitro*.

Keywords: macrophages; lymphocytes; carcinoma; reprogramming, immune response.

For citation: Kalish S.V., Lyamina S.V., Raetskaya A.A., Budanova O.P., Malyshev I.Yu. Programming the anti-tumor immune response *in vitro* and its application to stop the growth of tumor cells and prolonging the lifespan of mice with carcinoma *in vivo* *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(4): 67–73. (in Russian). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8525

For correspondence: Igor Yu. Malyshev, Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Pathological Physiology of the Moscow State University of Medicine and Dentistry n.a. A.I. Evdokimov; 20, str. 1, ul. Delegatskaya, d., Moscow, 127473, Russia, Head of stress and adaptation laboratory of the Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8, ul. Baltiyskaya, Moscow, 125315, Russian Federation, e-mail: iymalyshev1@gmail.com

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

Acknowledgments. The study was conducted with the Governmental financial support represented by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Agreement dated May 5, 2016, № 14.W02.16.9835-H11)

Information about authors:

Malyshev I.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-2381-9612>

Received 29.05.2017

Введение

Важную роль в нарушении иммунного ответа при развитии опухоли играют макрофаги [1, 2]. В зависимости от микроокружения, макрофаги могут приобретать или провоспалительный M1 фенотип, или противовоспалительный M2 [3–7]. M1 макрофаги содействуют уничтожению опухолевых клеток благодаря продукции оксида азота (NO) [8], провоспалительных цитокинов [9, 10], активации натуральных киллеров [11] и презентации опухолевых антигенов лимфоцитам [12]. Однако многие опухоли продуцируют много противовоспалительных цитокинов, таких, как TGF- β , IL-10 и IL-13 [13, 14], которые через активацию факторов транскрипции M2 фенотипа STAT3, STAT6 и SMAD3 перепрограммируют антиопухолевые M1 макрофаги в проопухолевые M2 [15, 16]. При этом M2 фенотип макрофагов продуцирует большое количество противовоспалительных цитокинов, плохо представляют опухолевые антигены [17–19] и благодаря этому промотируют рост опухоли [1, 2].

Ранее мы показали, что блокирование STAT3, STAT6 и SMAD3 предупреждает проопухолевое репрограммирование M1 макрофагов. M1 макрофаги с заблокированными STAT3, STAT6 и SMAD3, в отличие от исходных M1 макрофагов, в ответ на действие проопухолевых противовоспалительных цитокинов отвечали усилением продукции антиопухолевых провоспалительных цитокинов и благодаря этому сохраняли свои антиопухолевые свойства и замедляли деление опухолевых клеток *in vitro* и увеличивали продолжительность жизни мышей с карциномой Эрлиха (КЭ) [20]. Мы обозначили такой фенотип макрофагов как фенотип переключения, или как M3 фенотип [16, 20].

В иммунной системе за эффективное уничтожение опухолевых клеток отвечают антиген-специфические лимфоциты. Макрофаги могут выполнять функции антиген-презентирующих клеток и способствовать формированию антиген-специфических T и Th1 лимфоцитов. Однако в условиях *in vivo* опухоль нарушает процесс антиген-презентации и формирование антиген-специфических цитотоксических лимфоцитов из T лимфоцитов и Th1 лимфоцитов из Th0 лимфоцитов [21].

Учитывая эти данные, мы предположили, что проведение презентации антигенов опухоли для лимфоцитов с помощью M3 макрофагов *in vitro*, в отсутствие опухолевых клеток, может привести к противоопухолевому программированию лимфоцитов и получению пула иммунных клеток (макрофагов и лимфоцитов) с выраженными противоопухолевыми свойствами. Можно ожидать, что комбинированный пул репрограммированных макрофагов и лимфоцитов будет эффективно ограничивать рост опухолевых клеток *in vitro* и при введении в организм будет существенно ограничивать развитие опухоли *in vivo*. Цель исследования состояла в проверке этой гипотезы.

Методика

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

Реактивы. Stat3 ингибитор (S31204) (Axon Medchem, USA, cat# 2312), Stat6 ингибитор

(As1517499) (Axon Medchem, USA, cat# 1992), IFN- (Invitogen, USA, cat# PMC4034), LPS (Sigma-Aldrich, USA, cat# L3755), SMAD3 inhibitor (SIS3) (Calbiochem, USA, cat# 566405), FBS (Thermo Hyclone, UK, cat# SV30160.03), и лекарственная форма cisplatin (TEVA, Israel).

Моделирование карциномы Эрлиха. Опухолевый рост инициировали с помощью внутрибрюшинного введения клеток карциномы Эрлиха (КЭ). Клетки опухоли были получены в «Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина». Мышам вводили 250 тысяч опухолевых клеток, разведенных в 0,2 мл физиологического раствора. В кривой роста опухоли различают 3 периода:

- лаг-фаза — 1-е — 5-е сут. после введения опухолевых клеток;
- лог-фаза — 6-е — 10-е сут.;
- терминальный период, 11-е — 15-е сут., за которыми следует гибель организма.

Выбор модели КЭ определяется тем, что:

1. КЭ воспроизводит многие аспекты канцерогенеза опухоли поджелудочной железы, рака яичников, рака толстой и прямой кишки и рака простатической железы [22, 23, 25].

2. Мышиную модель КЭ обычно используют для оценки противоопухолевых эффектов [26, 27].

3. КЭ легко воспроизводится экспериментально.

Получение культуры опухолевых клеток. Мышей через 7—9 сут. после введения клеток КЭ, декапитировали под эфирным наркозом, отбирали асцитическую жидкость в объеме 3—4,5 мл. Асцитическую жидкость центрифугировали 4 мин при 1000 об/мин, при 4°C. Супернатант сливали, а к осадку добавляли среду RPMI-1640 без сыворотки и ресуспензировали. Затем отбирали 10 мкл в пробирки, добавляли 90 мкл RPMI-1640 (разведение в 10 раз) и производили подсчет клеток в камере Горяева. После этого доводили концентрацию клеток из асцитической жидкости до 100 тыс. кл. в 20 мкл.

Выделение макрофагов. Нативные макрофаги (M0 фенотип) были выделены у мышей путем перитонеального смыва [28]. После выделения из перитонеальной жидкости макрофаги культивировали в питательной среде RPMI-1640, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку (FBS), 100 ЕД/мл пеницилина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37°C в 5% CO₂.

In vitro репрограммирование макрофагов на M3-STAT3/6-SMAD3 фенотип. Были получены макрофаги с M0 фенотипом и с M3-STAT3/6-SMAD3 фенотипом. Для получения M0 фенотипа макрофаги культивировали в течение 12 ч с 10% FBS, а затем стимулировали липополисахаридом (ЛПС) (500 нг/мл) в течение 24 ч. Для получения M3-STAT3/6-SMAD3 фенотипа макрофаги культивиро-

вали в течение 12 ч без FBS [4] с добавлением IFN-γ (20 нг/мл) [29], ингибитора STAT3 (5 мкг/мл), ингибитора STAT6 (10 мкг/мл) и ингибитора SMAD3 (2 нмоль/мл) [20], а затем стимулировали ЛПС в концентрации 500 нг/мл еще в течение 24 ч.

Лизис опухолевых клеток для получения опухолевых антигенов. Концентрацию клеток КЭ в культуре, полученной по методу, описанному выше в разделе «Получение культуры опухолевых клеток» доводили до 500 тыс. кл. в 20 мкл. Полученную суспензию подвергали трем циклам заморозки и разморозки [30], где каждый цикл состоял из одночасового замораживания на -80°C и 10-минутного размораживания при 37°C. В результате все структуры клеток разрушались и в полученную взвесь попадали поверхностно-клеточные и внутриклеточные опухолевые антигены.

Выделение лимфоцит-содержащей клеточной фракции из селезенки. Выделение лимфоцит-содержащей клеточной фракции из селезенки проводили по методу, описанному Goldberg S [31]. Кратко: у животных выделяли селезенку и размещали в фарфоровый покрытый стеклянкой глазурью гомогенизатор. Затем к 1 селезенке в гомогенизаторе добавляли 2 мл 10-ммолярного раствора ЭДТА и гомогенизировали в течение 2 мин при 4°C. Полученную суспензию фильтровали через капроновый фильтр (USA, Falcon, cat 352360, 100 нм) и после этого фильтрат центрифугировали в течение 4 мин, при 1000 об/мин, при 4°C. Надосадочную жидкость сливали, добавляли повторно 10 ммолярный раствор ЭДТА 4°C, объемом равным или немного большим объема клеточного осадка и вновь ресуспензировали. Полученную суспензию помещали на шейкер на 5 мин при 4°C. После этого суспензию центрифугировали 4 мин, при 1000 об/мин, при 4°C и оценивали степень лизиса эритроцитов по цвету осадка. Если осадок был красный, вновь добавляли 10 ммолярный раствор ЭДТА 4°C, объемом равным или немного большим клеточного осадка. Смесь ресуспензировали и полученную суспензию помещали на шейкер на 5 мин при 4°C и затем центрифугировали 4 мин, при 1000 об/мин, при 4°C. Если осадок не был красным — супернатант сливали, заменяли на RPMI-1640, объемом в 2 раза большим объема осадка, и ресуспензировали. Затем производили подсчет клеток и доводили концентрацию до 500 тыс. клеток на 10 мкл. В полученной из селезенки клеточной фракции лимфоциты составляют подавляющее большинство [32].

Культирование макрофагов с лизатом опухолевых клеток, с лимфоцит-содержащей клеточной фракцией из селезенки и с клетками КЭ in vitro. Для удобства здесь мы обозначили макрофаги буквой «М», лизат опухолевых клеток, содержащий

опухолевые антигены — «А» и лимфоцит-содержащую клеточную фракцию селезенки — «Л». В условиях *in vitro* были сформированы 4 группы:

1. «М0-А-Л» — группа, в которой для антигенпрезентации использовали М0 макрофаги;
2. «М3-STAT3/6-SMAD3-А-Л» — группа, в которой для антигенпрезентации использовали М3-STAT3/6-SMAD3 макрофаги;
3. «А-Л» — группа, в которой кокультивировали лизат опухолевых клеток с лимфоцит-содержащей клеточной фракцией селезенки без макрофагов;
4. «Л» — группа, в которой культивировали только лимфоцит-содержащую клеточную фракцию селезенки без макрофагов и без лизата опухолевых клеток.

В этих группах количество макрофагов составляло 500 тыс. клеток, количество лизата опухолевых клеток — 5 мкл, и количество клеток лимфоцит-содержащей клеточной фракции селезенки — 500 тыс. клеток.

К каждой из групп добавляли 25 000 клеток КЭ и кокультивировали в течение 24 ч. После этого макрофаги и опухолевые клетки были разделены по методу, описанному ранее [19]. Затем опухолевые клетки подсчитывали и сравнивали с количеством опухолевых клеток, которые культивировали без макрофагов. Противоопухолевый препарат цисплатин [33, 34] использовали в концентрации 10, 20 и 40 мкг/мл в качестве препарата сравнения.

Инъекция макрофагов и лимфоцитов в брюшную полость. Клетки групп «М0-А-Л», «М3-STAT3/6-SMAD3-А-Л»; «А-Л» и «Л» были удалены со дна лунки культурального планшета путем инкубирования при 37°C в присутствии PBS, содержащий 5 mM ЭДТА [5]. Концентрация макрофагов и лимфоцитов была доведена до 8×10^6 клеток в 0,2 мл PBS. Далее мышам внутрибрюшинно вводили клетки перечисленных выше групп на 1-е, 3-е, 5-е и 7-е сут.

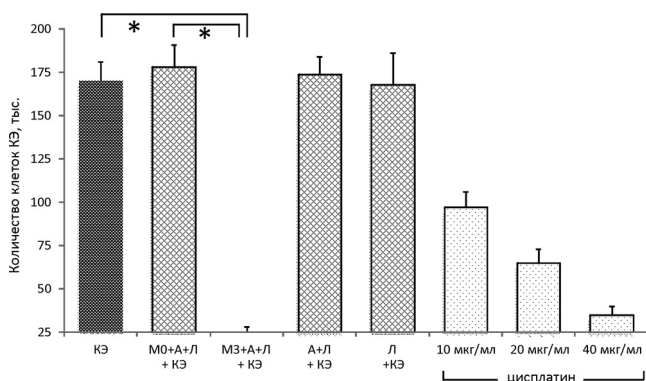


Рис. 1. Эффект М3-STAT3/6-SMAD3 макрофагов и антиген-репрограммированных лимфоцитов на рост опухолевых клеток КЭ. КЭ — клетки карциномы Эрлиха. Представлены данные 5 повторов. Значимые различия между группами «КЭ» и «М3-STAT3/6-SMAD3+А+Л» и группами «М0+А+Л» и «М3-STAT3/6-SMAD3+А+Л»: ** $p < 0,01$.

после инъекции клеток КЭ. В итоге было сформировано 6 групп животных по 18 крыс в каждой:

- Группа «Опухоль» — мыши, которым ввели клетки КЭ;
- Группа «Опухоль + М0-А-Л» — мыши, которым вводили клетки КЭ и клетки группы М0-А-Л;
- Группа «Опухоль + М3-STAT3/6-SMAD3-А-Л» — мыши, которым вводили клетки КЭ и клетки группы М3-STAT3/6-SMAD3-А-Л;
- Группа «Опухоль + А-Л» — мыши, которым вводили клетки КЭ и клетки группы А-Л;
- Группа «Опухоль + Л» — мыши, которым вводили клетки КЭ и клетки группы Л;
- Группа «Опухоль+цисплатин» — мыши, которым вводили клетки КЭ и 0,05 мл цисплатина (0,5 мг/мл) в качестве противоопухолевого препарата [33—35].

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

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

Результаты и обсуждение

1. М3-STAT3/6-SMAD3 макрофаги и антиген-репрограммированные лимфоциты полностью останавливают деление клеток карциномы Эрлиха *in vitro*

На рис. 1 видно, что в процессе 24-часового культивирования в среде, содержащей 10% FBS, количество опухолевых клеток увеличилось в 7 раз: с 25 000 до $170\,000 \pm 11\,000$ клеток. Кокультивирование клеток КЭ с клетками групп «М0-А-Л», «А-Л» и «Л» статистически значимо не влияло на пролиферацию опухолевых клеток.

Добавление клеток группы «М3-STAT3/6-SMAD3-А-Л» практически полностью остановило деление опухолевых клеток КЭ. При этом видно, что противоопухолевый эффект клеток группы «М3-STAT3/6-SMAD3-А-Л» существенно превышал эффект препарата цисплатин.

2. М3-STAT3/6-SMAD3 макрофаги и антиген-репрограммированные лимфоциты продемонстрировали выраженный антиопухолевый эффект *in vivo*

Для того, чтобы оценить, воспроизводится ли противоопухолевый эффект репрограммированных макрофагов и лимфоцитов *in vitro* в условиях *in vivo*, было оценено действие клеток группы «М3-STAT3/6-SMAD3-А-Л» на продолжительность жизни мышей с карциномой Эрлиха.

На рис. 2 представлен эффект введения M3.STAT3/6-SMAD3 макрофагов и антиген-репрограммированных лимфоцитов и цисплатина на продолжительность жизни мышей с КЭ в кривых выживаемости по Каплану—Мейеру. Продолжительность жизни мышей группы «Опухоль», которым вводили клетки КЭ, составила $15,3 \pm 0,3$ сут.; продолжительность жизни мышей группы «Опухоль + M0-A-L» составила $13,3 \pm 0,2$ сут. ($p < 0,01$), что на 13% меньше, чем в группе «Опухоль». Продолжительность жизни мышей группы «Опухоль + M3.STAT3/6-SMAD3-A-L» составила $37,2 \pm 0,7$ сут. ($p < 0,01$), что на 143% больше, чем в группе «Опухоль». Противоопухолевый эффект клеток группы «M3.STAT3/6-SMAD3-A-L» оказался существенно более выраженным, по сравнению с эффектом цисплатина.

Добавление клеток групп «A+L» или одного антигена (группа «A»), или одних лимфоцитов (группа «L») мышам с опухолью не оказало существенного влияния на продолжительность жизни мышей.

Таким образом, инъекции клеток группы «M3.STAT3/6-SMAD3-A-L» значительно повысило устойчивость мышей к развитию КЭ. Результаты проведенного исследования подтвердили нашу гипотезу о том, что опухолевый рост может быть эффективно ограничен с помощью M3 макрофагов с ингибированными факторами транскрипции M2 фенотипа: STAT3, STAT6 и SMAD3 в сочетании с антиген-репрограммированными лимфоцитами. При использовании M0 макрофагов вместо M3 эффект группы «M0-A-L» оказался противоположным. Добавление этой группы клеток снизило продолжительность жизни мышей с опухолью. Эти данные хорошо коррелирует с представлением о проопухолевой трансформации макрофагов в зоне опухоли [13—16].

Макрофаги уже давно привлекают внимание в качестве мишеней для противоопухолевой терапии. Антиопухолевую активность макрофагов пытались усилить путем стимуляции Toll-like рецепторов и ингибирования рецепторов к TGF- β [36]; культивирования в среде без сыворотки [5]; усиления активности генов, отвечающих за экспрессию IFN- γ и IL-12 [37]; связывания проопухолевых факторов или их рецепторов на макрофагах [38, 39] и т.д. Все эти подходы направлены на формирование противоопухолевого M1 фенотипа, но опухоль перепрограммирует M1 фенотип в M2 [15], что снижает эффективность M1 макрофагов [40].

По сравнению с M1 макрофагами, M3 макрофаги с ингибированными факторами транскрипции STAT3, STAT6 и/или SMAD3 оказывали более выраженное противоопухолевое действие *in vitro* и способствовали увеличению продолжительности жизни

ни мышей с КЭ [20, 40]. Более выраженный противоопухолевый эффект этих макрофагов по сравнению с M1 может быть связан с большей воспалительной активностью M3 макрофагов с ингибированными STAT3, STAT6 и/или SMAD3 и способностью сохранять антиопухолевые свойства в проопухолевой среде.

Ограничение эффективности использования M3 макрофагов связано с тем, что опухоль снижает активность и перепрограммирует не только макрофаги, но и лимфоциты [41], а именно лимфоциты являются главными клетками, отвечающими за уничтожение опухоли. Опухоль снижает способность антиген-презентирующих клеток захватывать и осуществлять презентацию опухолевых антигенов лимфоцитам [23]. Понимание механизмов опухолевой трансформации привело нас к гипотезе, что предварительное репрограммирование макрофагов на M3 фенотип и антиген-зависимое репрограммирование лимфоцитов в условиях *in vitro*, в условиях отсутствия угнетающего и репрограммирующего действия опухоли, может существенно увеличить антиопухолевую эффективность иммунных клеток. Действительно, ранее мы показали, что инъекции только M3 макрофагов мышам с карциномой Эрлиха, увеличивает продолжительность жизни этих мышей примерно на 100% [20], тогда как в настоящей работе инъекции M3 макрофагов вместе с *in vitro* антиген-репрограммированными лимфоцитами, увеличивали продолжительность жизни таких же мышей с опухолью на 143%. Макрофаги являются клетками врожденного, а лимфоциты — адаптивного иммунного ответа, поэтому в данной работе, по сути, была продемонстрирована возможность программирования антиопухолевого иммунного ответа

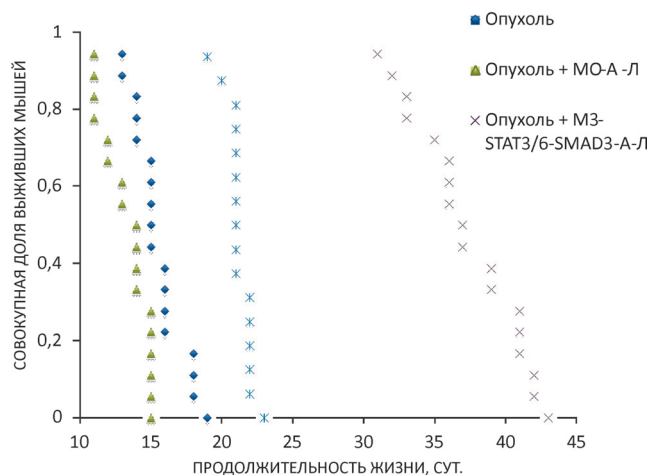


Рис. 2. Эффект введения M3.STAT3/6-SMAD3 макрофагов и антиген-репрограммированных лимфоцитов, в сравнении с эффектом цисплатина на продолжительность жизни мышей с КЭ (по анализу выживаемости по Каплану—Мейеру).

in vitro (в пробирке), в условиях отсутствия влияния опухоли, и дальнейшего эффективного использования в условиях *in vivo*.

Обнаруженные в работе факты, что М3 макрофаги в сочетании с антиген-репрограммированными лимфоцитами значительно подавляют рост опухоли, делают перспективным разработку клинической версии биотехнологии ограничения роста опухоли путем предварительного программирования антиопухолевого иммунного ответа «в пробирке».

References

1. Condeelis J., Pollard J.W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 2006; 124(2): 263-6.
2. Sica A., Schioppa T., Mantovani A., Allavena P. Tumor-associated macrophages are a distinct M2 polarized population promoting tumor progression: potential targets of anti-cancer therapy. *European Journal of Cancer*. 2006; 42(6): 717-27.
3. Mills C.D., Thomas A.C., Lenz L.L., Munder M. Macrophage: SHIP of Immunity. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5: 620.
4. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *The Journal of Immunology*. 2000; 164(12): 6166-73.
5. Rey-Giraud F., Hafner M., Ries C.H. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One*. 2012; 7(8): e42656.
6. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*. 2000; 5: 953-964.
7. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*. 2002; 23(11): 549-55.
8. Zeini M., Traves P.G., Lopez-Fontal R., Pantoja C., Matheu A., Serrano M. et al. Specific contribution of p19 (ARF) to nitric oxide-dependent apoptosis. *The Journal of Immunology*. 2006; 177(5): 3327-36.
9. Tsung K., Dolan J.P., Tsung Y.L., Norton J.A. Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced T cell-dependent tumor rejection. *Cancer Research*. 2002; 62(17): 5069-75.
10. Ibe S., Qin Z., Schuler T., Preiss S., Blankenstein T. Tumor rejection by disturbing tumor stroma cell interactions. *The Journal of Experimental Medicine*. 2001; 194(11): 1549-1559.
11. Sharma M. Chemokines and their receptors: orchestrating a fine balance between health and disease. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2009; 30(1): 1-22.
12. Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004; 21(2): 137-48.
13. Khong H.T., Restifo N.P. Natural selection of tumor variants in the generation of «tumor escape» phenotypes. *Nature Immunology*. 2002; 3(11): 999-1005.
14. Zou W. Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2006; 6(4): 295-307.
15. Stout R.D., Watkins S.K., Suttles J. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. 2009; 86(5): 1105-9.
16. Malyshev I., Malyshev Yu. Current concept and update of the macrophage plasticity concept: intracellular mechanisms of reprogramming and M3 macrophage «switch» phenotype. *BioMed Research International*. 2015; 2015: 341308.
17. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumor-induced dendritic-cell defects. *Nature Reviews Immunology*. 2004; 4 (12): 941-52.
18. Kono Y., Kawakami S., Higuchi Y., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M. Antitumor effect of nuclear factor- κ B decoy transfer by mannose-modified bubble lipoplex into macrophages in mouse malignant ascites. *Cancer Science*. 2014; 105(8): 1049-55.
19. Kalish S.V., Lyamina S.V., Usanova E.A., Manukhina E.B., Larionov N.P., Malyshev I.Yu. Macrophages reprogrammed in vitro towards the M1 phenotype and activated with LPS extend lifespan of mice with ehrlich ascites carcinoma. *Medical Science Monitor Basic Research*. 2015; 21: 226-34.
20. Kalish S., Lyamina S., Manukhina E., Malyshev Y., Raetskaya A., Malyshev I. M3 Macrophages Stop Division of Tumor Cells In Vitro and Extend Survival of Mice with Ehrlich Ascites Carcinoma. *Medical science monitor basic research*. 2017; 23: 8-19.
21. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature reviews. Immunology*. 2004; 4(12): 941-52.
22. Cavazzoni E., Bugiantella W., Graziosi L., Franceschini M.S., Donini A. Malignant ascites: pathophysiology and treatment. *International Journal of Clinical Oncology*. 2013; 18(1): 1-9.
23. Becker G., Galandi D., Blum H.E. Malignant ascites: systematic review and guideline for treatment. *European Journal of Cancer*. 2006; 42(5): 589-97.
24. Ahmed N., Stenvers K.L. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Frontiers in Oncology*. 2013; 3: 256.
25. Saif M.W., Siddiqui I.A., Sohail M.A. Management of ascites due to gastrointestinal malignancy. *Annals of Saudi Medicine*. 2009; 29(5): 369-77.
26. Kono Y., Kawakami S., Higuchi Y., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M. Antitumor effect of nuclear factor- κ B decoy transfer by mannose-modified bubble lipoplex into macrophages in mouse malignant ascites. *Cancer Science*. 2014; 105(8): 1049-55.
27. Ray T., Chakrabarti M.K., Pal A. Hemagglutinin protease secreted by *V. cholerae* induced apoptosis in breast cancer cells by ROS mediated intrinsic pathway and regresses tumor growth in mice model. *Apoptosis*. 2016; 21(2): 143-54.
28. Zhang X., Goncalves R., Mosser D.M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Current Protocols in Immunology*. 2008; Chapter 14: Unit 14.1.
29. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience*. 2008; 1(13): 453-61.
30. Briard J.G., Poisson J.S., Turner T.R., Capicciotti C.J., Acker J.P., Ben R.N. Small molecule ice recrystallization inhibitors mitigate red blood cell lysis during freezing, transient warming and thawing. *Scientific reports*. 2016; 6: 23619.
31. Goldberg S. Mechanical/physical methods of cell disruption and tissue homogenization. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2008; 424: 3-22.

32. Lejtenyi D., Osmond D.G., Miller S.C. Natural killer cells and B lymphocytes in L-selectin and Mac-1/LFA-1 knockout mice: marker-dependent, but not cell lineage-dependent changes in the spleen and bone marrow. *Immunobiology*. 2003; 207(2): 129-35.
33. Roco A., Cayun J., Contreras S., Stojanova J., Quicones L. Can pharmacogenetics explain efficacy and safety of cisplatin pharmacotherapy? *Frontiers in Genetics*. 2014; 5: 391.
34. Chen T.C., Cho H.Y., Wang W., Wetzel S.J., Singh A., Nguyen J. et al. Chemotherapeutic effect of a novel temozolomide analog on nasopharyngeal carcinoma in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Science*. 2015; 22(1): 71.
35. Noël W., Raes G., Hassanzadeh Ghassabeh G., De Baetselier P., Beschin A. Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends in Parasitology*. 2004; 20(3): 126-33.
36. Peng J., Tsang J.Y., Li D., Niu N., Ho D.H., Lau K.F. et al. Inhibition of TGF- β signaling in combination with TLR7 ligation re-programs a tumoricidal phenotype in tumor-associated macrophages. *Cancer Letters*. 2013; 331(2): 239-49.
37. Satoh T., Saika T., Ebara S., Kusaka N., Timme T.L., Yang G. et al. Macrophages transduced with an adenoviral vector expressing IL-12 suppress tumor growth and metastasis in a preclinical metastatic prostate cancer model. *Cancer Research*. 2003; 63(22): 7853-60.
38. Baay M., Brouwer A., Pauwels P., Peeters M. and Lardon F. Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. *Clinical and Developmental Immunology*. 2011; 2011: 565187.
39. Aharinejad S., Abraham D., Paulus P., Abri H., Hofmann M., Grossschmidt K. Colony-stimulating factor-1 antisense treatment suppresses growth of human tumor xenografts in mice. *Cancer Research*. 2002; 62(18): 5317-24.
40. Malyshev I.Yu. Phenomena and signaling mechanisms reprogramming of macrophages. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2015; 59(2): 99-111. (in Russian)
41. Lee P.P., Yee C., Savage P.A., Fong L., Brocksedt D., Weber J.S., Johnson D., Swetter S., Thompson J., Greenberg P.D., Roederer M., Davis M.M. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nature medicine*. 1999; 5(6): 677-85.

Сведения об авторах:

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

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

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

Буданова Ольга Петровна, лаборант каф. регуляторных механизмов стресса и адаптации ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», e-mail: ova17@list.ru

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092.6

Новицкий В.В.¹, Янкович К.И.^{1,2}, Колобовникова Ю.В.¹, Дмитриева А.И.^{1,2},
Уразова О.И.¹, Пурлик И.Л.^{1,2}, Кудяков Л.А.², Чумакова С.П.¹

Механизмы формирования опухолеассоциированной тканевой эозинофилии при раке желудка и толстой кишки

¹ ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, 634050, г. Томск, Россия, Московский тракт, д. 2

² ОГАУЗ Томский областной онкологический диспансер, 634050, г. Томск, Россия, пр. Ленина, д. 115

Опухолеассоциированная тканевая эозинофилия определяется как эозинофильная инфильтрация стромы опухоли. Эта реакция, как полагают, играет важную роль в канцерогенезе. Считается, что эозинофилы обладают противоопухолевой активностью за счет высвобождения цитотоксических белков. **Цель исследования** — изучение молекулярно-генетических механизмов формирования опухолеассоциированной тканевой эозинофилии у больных раком желудка и толстой кишки. **Методика.** Материалом исследования служили образцы опухолевой ткани пациентов с диагнозом *рак желудка или толстой кишки*. Подсчитывали количество эозинофилов, инфильтрирующих опухолевую ткань, а также оценивали экспрессию эотаксина-1 (ключевого фактора хемотаксиса эозинофилов) и его рецептора CCR3 в опухолевой ткани методом иммуногистохимии. Было изучено распределение полиморфных вариантов генов *CCL11 (A384G)*, *CCR3 (T51C)*, *IL5 (C703T)* и *IL5R (G80A)*. Геномную ДНК выделяли из образцов опухолевой ткани. Генотипирование образцов ДНК по полиморфизмам генов осуществляли путем ПДРФ-анализа продуктов ПЦР-амплификации специфических участков генома с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете. **Результаты.** Показана более высокая экспрессия эотаксина-1 и CCR3 в ткани опухоли при раке желудка и толстой кишки, ассоциированном с эозинофилией. Установлена ассоциация эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани с носительством генотипа *CC* и аллеля *C* полиморфизма *T51C* гена *CCR3* и генотипа *CC* и аллеля *C* полиморфизма *C703T* гена *IL5*. **Заключение.** Формирование опухолеассоциированной тканевой эозинофилии при раке желудка и толстой кишки опосредованно действием эотаксина-1 и его рецептора. Результаты молекулярно-генетического исследования указывают на генетически детерминированный характер эозинофилии при раке желудка и толстой кишки.

Ключевые слова: эозинофилия; эотаксин; интерлейкин-5; рецепторы; полиморфизм генов; рак желудка; рак толстой кишки.

Для цитирования: Новицкий В.В., Янкович К.И., Колобовникова Ю.В., Дмитриева А.И., Уразова О.И., Пурлик И.Л., Кудяков Л.А., Чумакова С.П. Механизмы формирования опухолеассоциированной тканевой эозинофилии при раке желудка и толстой кишки. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 74–80. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8526

Для корреспонденции: Янкович Кристина Игоревна, аспирант каф. патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России; врач клин. лаб. диагностики КДЛ ОГАУЗ «ТООД», e-mail: yankovich-kristina@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых Грант № 14.W01.17.842-МД и ведущих научных школ Российской Федерации Грант № 14.W02.16.7906-НШ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.03.2017

Novitsky V.V.¹, Yankovich K.I.^{1,2}, Kolobovnikova Yu.V.¹, Dmitrieva A.I.^{1,2},
Urazova O.I.¹, Purlik I.L.^{1,2}, Kudjakov L.A.², Chumakova S.P.¹

The formation mechanisms of tumor-associated tissue eosinophilia in gastric cancer and colon cancer

¹ Siberian State Medical University, Moskovskiy tract, 2, 634050 Tomsk

² Tomsk Regional Oncology Center, Lenina pr., 115, 634050 Tomsk

Tumor-associated tissue eosinophilia is defined as eosinophilic stromal infiltration of a tumor. Tumor-associated tissue eosinophilia is believed to play a significant role in carcinogenesis. It is believed that eosinophils have antitumor activity due to the release of cytotoxic proteins. **The aim** of this study was to investigate the molecular-genetic mechanisms of formation of tumor-associated tissue eosinophilia in patients with gastric cancer and colon cancer. **Methods.** Tumor tissue samples

from patients with gastric cancer and colon cancer were reviewed. We counted the number of infiltrating eosinophils in neoplastic lesion tissue and we evaluated the expression of eotaxin-1 (a key factor of chemotaxis of eosinophils) and its receptor CCR3 in tumor tissue by immunohistochemical staining. The distribution of polymorphic variants of genes *CCL11* (*A384G*), *CCR3* (*T51C*), *IL5* (*C703T*) and of the *IL5R* (*G80A*) was studied. DNA was isolated from tumor tissue samples. Genotyping of polymorphisms was carried out by polymerase chain reaction (PCR), followed by digestion with the appropriate restriction enzyme (PCR-RFLP) and agarose-gel electrophoresis. **Results.** It is shown that higher expression eotaxin-1 and CCR3 is determined in the tumor tissue of gastric cancer and colon cancer associated with eosinophilia. It is established that eosinophilic infiltration of the tumor tissue is associated with the carriers of CC genotype and C allele of the gene *CCR3* (*T51C*) and CC genotype and C allele of gene *IL5* (*C703T*). **Conclusion.** The formation of tumor-associated tissue eosinophilia in gastric cancer and colon cancer is mediated through the action eotaxin-1 and its receptor. The results of molecular-genetic studies indicate a genetically determined character of eosinophilia in gastric cancer and colon cancer.

Keywords: eosinophilia; eotaxin; interleukin-5; receptors; gene polymorphism; gastric cancer; colon cancer.

For citation: Novitsky V.V., Yankovich K.I., Kolobovnikova Yu.V., Dmitrieva A.I., Urazova O.I., Purlik I.L., Kudyakov L.A., Chumakova S.P. The formation mechanisms of tumor-associated tissue eosinophilia in gastric cancer and colon cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61 (4): 74—80. (in Russian). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8526

For correspondence: Kristina I. Yankovich, PhD-student of Pathophysiology department, «Siberian State Medical University»; 2 Moskovskiy Tract, Tomsk 634050, Russian Federation; doctor of clinical laboratory diagnostics, «Tomsk Regional Oncology Center»; 115 Lenina pr., Tomsk 634050, Russian Federation, e-mail: yankovich-kristina@mail.ru

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

Acknowledgments. The work was supported by the Grant Council of the President of the Russian Federation for the state support of young Russian scientists Grant № 14.W01.17.842-YD and leading scientific schools of the Russian Federation Grant № 14.W02.16.7906-SS.

Information about authors:

Novitsky V.V., <http://orcid.org/0000-0002-9577-8370>

Yankovich K.I., <http://orcid.org/0000-0001-8893-0939>

Kolobovnikova Yu.V., <http://orcid.org/0000-0001-7156-2471>

Dmitrieva A.I., <http://orcid.org/0000-0002-5247-9872>

Urazova O.I., <http://orcid.org/0000-0002-9457-8879>

Purlik I.L., <http://orcid.org/0000-0003-3757-0173>

Chumakova S.P., <http://orcid.org/0000-0003-3468-6154>

Received 06.03.2017

Введение

Рак желудка и толстой кишки весьма часто сопровождается эозинофильной инфильтрацией опухолевой ткани, что в современной литературе обозначается как опухолеассоциированная тканевая эозинофилия (ТАТЕ — Tumor-Associated Tissue Eosinophilia) [1—3]. По современным представлениям, эозинофильные гранулоциты способны взаимодействовать с опухолевыми клетками, а также другими элементами внутриопухолевого и околоопухолевого микроокружения [3, 4]. Миграцию эозинофилов в ткани, в том числе в ткань новообразований, обеспечивают цитокины, среди которых ключевую роль играют эотаксин-1 (*CCL11* — C-C motif chemokine ligand 11) и интерлейкин (IL) 5, действующие посредством связывания со специфическими рецепторами CCR3 и IL-5R соответственно [5—7]. В желудочно-кишечном тракте (основном месте локализации тканевых эозинофилов)

в норме регистрируется более выраженная экспрессия *CCL11*, чем в других тканях организма [1]. Гиперэкспрессия эотаксина-1 отмечается также при воспалении, аллергии и гельминтозах, ассоциированных с эозинофилией [1].

Известно, что функциональная активность белковых молекул определяется полиморфными вариантами соответствующих генов. В литературе описаны ассоциации аллельных вариантов генов цитокинов и их рецепторов с характером экспрессии соответствующих белков и предрасположенностью к определенным заболеваниям [6—9]. Изучение полиморфизма генов цитокинов, принимающих участие в формировании эозинофилии, позволит оценить вклад наследственного фактора в развитие ТАТЕ.

Цель — исследование молекулярно-генетических механизмов формирования опухолеассоциированной тканевой эозинофилии у больных раком желудка и толстой кишки.

Методика

Исследование выполнено на базе ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер» (ОГАУЗ «ТООД»). В исследование были включены 52 больных раком желудка и 55 больных раком толстой кишки, находившихся на лечении и состоящих на диспансерном учете в ОГАУЗ «ТООД», которые давали информированное согласие на участие в исследовании. Все пациенты были прооперированы до начала проведения специфической лучевой и цитостатической терапии. Пациенты были разделены на группы в зависимости от наличия или отсутствия эозинофильной инфильтрации ткани опухоли, а также от локализации опухолевого процесса. В группу пациентов со злокачественными новообразованиями желудочно-кишечного тракта, сопровождающимися тканевой эозинофилией, вошли 25 больных раком желудка (средний возраст $65,3 \pm 4,7$ года) и 23 больных раком толстой кишки (средний возраст $63,0 \pm 7,3$ года). Среди обследованных пациентов, в опухолевой ткани которых не регистрировалась эозинофильная инфильтрация, у 27 пациентов был верифицирован рак желудка (средний возраст $62,9 \pm 5,2$ года), у 32 — рак толстой кишки (средний возраст $61,3 \pm 6,0$ лет). Для исследования аллельного полиморфизма генов цитокинов и их рецепторов группы пациентов были увеличены. Число больных раком желудка и толстой кишки, сопровождающимся тканевой эозинофилией, составило 204 человека, из них 100 пациентов с раком желудка (средний возраст $64,2 \pm 7,2$ года) и 104 пациента с раком толстой кишки (средний возраст $61,5 \pm 9,0$ лет). В группу пациентов без тканевой эозинофилии были включены 113 больных раком желудка (средний возраст $63,8 \pm 6,2$ года) и 110 больных раком толстой кишки (средний возраст $62,9 \pm 6,0$ лет). Критериями исключения пациентов из исследования были: наличие в анамнезе хронических воспалительных процессов, психических, аутоиммунных и/или наследственных заболеваний, аллергии и гельминтозов, а также опухолей других локализаций.

Материалом исследования служили архивные образцы тканей злокачественных новообразований желудка и толстой кишки, полученные при оперативном вмешательстве и заключенные в парафин. Подготовка материала для исследования, а также гистологическая верификация опухолей и иммуногистохимическое исследование проводились на базе патологоанатомического отделения ОГАУЗ «ТООД».

Эозинофильную инфильтрацию в слизистой и подслизистой оболочках оценивали полуколичественным методом путем прямого подсчета тканевых эозинофилов в «горячих точках» вблизи опухолевого поражения, просматривали не менее 20 полей зрения ($\times 400$) с помощью светового микроскопа Leica DM2000 (Leica Mic-

rosystems, Германия). Присутствие 10 и более эозинофилов в поле зрения расценивали как тканевую эозинофилию [1, 10]. При отсутствии или наличии единичных эозинофилов в поле зрения делали вывод об отсутствии опухолеассоциированной эозинофилии.

Исследование экспрессии CCL11 и CCR3 в опухолевой ткани проводили на парафиновых срезах методом иммуногистохимии с окрашиванием гематоксилином с использованием автоматического иммуногистостейнера (Leica Biosystems, Германия). В исследовании применяли моноклональные антитела фирмы «Abcam» (Великобритания) к CCL11 (клон EPR5825, рабочее разведение 1:100, кроличьи) и к CCR3 (клон Y31, рабочее разведение 1:100, кроличьи). Оценку экспрессии исследуемых белков в опухолевой ткани осуществляли полуколичественным способом в участках максимальной экспрессии маркера (в «горячих точках»), что более воспроизводимо, чем в случайных полях зрения. При исследовании экспрессии CCL11 проводили оценку интенсивности цитоплазматического окрашивания опухолевых клеток. В зависимости от интенсивности окрашивания все образцы были разделены на случаи с низкой экспрессией маркера (при отсутствии или бледно-желтом окрашивании) и случаи со средней силы экспрессией (при светло-коричневом окрашивании) [1], сильного позитивного иммуноокрашивания в железистых клетках не обнаруживалось.

Экспрессию CCR3 оценивали на мембране клеток воспалительного инфильтрата. Каждый образец содержал различное количество стромы, поэтому экспрессия маркера на стромальных клетках определялась как относительное количество положительно окрашенных клеток, а также учитывалась интенсивность окраски. При отсутствии окрашивания, при выявлении слабого по интенсивности окрашивания менее чем 30% клеток, инфильтрирующих ткань опухоли, или сильного окрашивания менее чем 15% клеток экспрессия CCR3 считалась низкой. Обнаружение положительной реакции любой интенсивности в более чем 30% стромальных клеток или сильного окрашивания менее 30% клеток расценивалось как высокая экспрессия маркера [1, 11]. Были просмотрены поля зрения вблизи паренхиматозного компонента опухоли и в строме новообразования на некотором отдалении от паренхиматозных структур.

Выделение ДНК из образцов тканей, полученных с границы резекции (нормальная ткань) проводили с использованием коммерческого набора «FFPET DNA — Extraction Kit» (Биолинк, Новосибирск). Генотипирование образцов ДНК по полиморфизмам генов CCL11 (A384G), CCR3 (T51C), IL5 (C703T) и IL5R (G80A) осуществляли путем ПДРФ-анализа продуктов ПЦР-амплификации

специфических участков генома с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете. Для ПЦР использовали специфичные пары праймеров, представленные в табл. 1 [6—8]. Реакционная смесь для ПЦР содержала 10 мкл образца ДНК, буфер для амплификации в финальной концентрации 1х, по 5 пмоль праймеров (Медиген, Новосибирск), 2 ед. акт. SuperHotTaq-ДНК-полимеразы, 1,5 ммоль/л $MgCl_2$, 0,8 ммоль/л смеси dNTP (Biogen GmbH, Германия) и дистиллированную воду конечного объема 50 мкл. Программа амплификации включала предварительную денатурацию при 94°C (5 мин), 30 циклов отжига при специфической для каждой пары праймеров температуре в течение 45 с (табл. 1), элонгации при 72°C (45 с) и денатурации при 94°C (45 с). Программу завершала элонгация при 72°C в течение 3 мин. Амплификат (7 мкл) подвергали гидролизу соответствующей рестриктазой (3—5 ед. акт.) при оптимальной для фермента температуре в течение 12 ч (табл. 1). Для всех изученных полиморфных вариантов генов распределение генотипов соответствовало ожидаемому при соблюдении условий равновесия Харди—Вайнберга.

Для расчета статистической значимости различий между группами сравнения проводили анализ таблиц

сопряженности с использованием критерия χ^2 Пирсона. Для определения меры связи между переменными вычисляли коэффициент ϕ . Относительный риск (OR — odds ratio) оценивали по стандартной формуле и указывали с доверительным интервалом 95% [12].

Результаты и обсуждение

Привлечение и миграция эозинофилов в ткани организма осуществляется при участии хемокинов и экспрессии соответствующих рецепторов. Специфическим хематтрактантом эозинофилов принято считать эотаксин-1 [1, 5], выраженной хемотаксической активностью обладает также IL-5 [6]. В нашей работе была проанализирована взаимосвязь между наличием опухолеассоциированной тканевой эозинофилии и уровнем экспрессии эотаксина-1 и его рецептора опухолевыми клетками у больных раком желудка и толстой кишки. Установлено, что в опухолях с эозинофильной инфильтрацией ткани, значительно чаще регистрировалась средне-сильная экспрессия эотаксина-1, в отличие от таковых при раке желудка и толстой кишки без эозинофилии (табл. 2). Выявлена относительно сильная связь между экспрессией эотаксина-1

Условия проведения генотипирования исследуемых полиморфизмов

Таблица 1

Ген	Структура праймеров	Температура отжига праймеров, °C	Фермент рестрикции	Длина продуктов рестрикции, пары нуклеотидов	
				Аллель дикого типа	Мутантный аллель
<i>CCL11</i> (<i>A384G</i>)	F: GGT-TTC-CTT-GCT-CCT-TTC-CTC R: GCA-GAA-CAG-AAG-AGA-GAG-GCA-A	58	<i>TaqI</i>	187; 17	204
<i>CCR3</i> (<i>T51C</i>)	F: CTT-TGG-TAC-CAC-ATC-CTA-CCA R: TGA-GAG-GAG-CTT-ACA-CAT-GC	55	<i>FaeI</i> (изошизомер <i>NlaIII</i>)	108; 22	130
<i>IL5</i> (<i>C703T</i>)	F: CAG-GGA-GAG-CCA-ATC-AGT R: ATG-ATG-TCC-AGA-CTC-CAG-GAT-CT	60	<i>PstNI</i> (изошизомер <i>AlwNI</i>)	160; 18	178
<i>IL5R</i> (<i>G80A</i>)	F: AT-GGC-TAT-CTG-GAC-GAG-AG R: TTA-GAG-GCG-GTT-CTT-CAC-TC	57	<i>AcsI</i>	206	154; 52

Экспрессия эотаксина-1 в опухолевых клетках у больных раком желудка и толстой кишки

Таблица 2

Экспрессия эотаксина-1	Локализация опухоли; количество больных в а.ч. (%)			
	Рак желудка (n = 52)		Рак толстой кишки (n = 55)	
	С тканевой эозинофилией (n = 25)	Без тканевой эозинофилии (n = 27)	С тканевой эозинофилией (n = 23)	Без тканевой эозинофилии (n = 32)
Низкая	5 (20%)	18 (66,7%)	8 (34,8%)	25 (78,1%)
Средне-сильная	20 (80%)	9 (33,3%)	15 (65,2%)	7 (21,9%)
	$\chi^2 = 11,460$; $p < 0,05$; $\phi = 0,469$		$\chi^2 = 8,746$; $p < 0,05$; $\phi = 0,436$	
Примечание. Здесь и в табл. 3: p — уровень статистической значимости различий между группами больных; χ^2 — критерий Хи-квадрат Пирсона; ϕ — критерий ϕ для оценки силы взаимосвязи между номинальными переменными; а.ч. — абсолютное число.				

и наличием опухолеассоциированной тканевой эозинофилии у пациентов с раком желудка и толстой кишки ($\phi = 0,469$ и $\phi = 0,436$ соответственно).

Эотаксин-1, экспрессируемый опухолевыми клетками, опосредует развитие эозинофильной инфильтрации путем усиления рекрутирования эозинофильных гранулоцитов в очаг поражения. Данный хемокин реализует свои эффекты при взаимодействии со специфическим рецептором CCR3, который экспрессируется на многих клетках, в том числе на эозинофилах, тучных клетках, лимфоцитах, обнаруживаемых в составе опухолевого микроокружения [7]. При оценке экспрессии рецептора CCR3 на стромальных клетках опухолей у больных раком желудка и толстой кишки с эозинофилией регистрировалась преимущественно высокая экспрессия этого рецептора (у 72% и 73,9% соответственно). При сравнении уровня экспрессии CCR3 в опухолевой ткани у обследованных нами пациентов в зависимости от наличия эозинофильной инфильтрации ткани новообразования статистически значимые различия были обнаружены только для опухолей желудка (табл. 3). Полученные результаты позволяют рассматривать CCR3-опосредованную миграцию эозинофилов в качестве ключевого механизма формирования опухолеассоциированной

тканевой эозинофилии при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта.

Анализируя возможные причины гиперэкспрессии факторов хемотаксиса эозинофилов у пациентов с раком желудка и толстой кишки, необходимо учитывать генетически детерминированный характер секреции медиаторов клетками и экспрессии ими рецепторных структур [7, 8]. В связи с этим было проанализировано распределение полиморфных вариантов генов эотаксина-1 (CCL11) и IL-5, а также их рецепторов CCR3 и IL-5R.

В ходе проведенного молекулярно-генетического исследования установлено преобладание аллеля А полиморфизма A384G гена CCL11 у всех обследованных лиц. Статистической значимости различий в распределении аллелей и генотипов данного полиморфизма у больных раком желудка и толстой кишки с эозинофильной инфильтрацией опухолевой ткани и без нее выявлено не было (табл. 4).

Анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма T51C гена CCR3 показал наличие статистически значимых его различий у больных раком желудка и толстой кишки в зависимости от наличия опухолеассоциированной тканевой эозинофилии (табл. 5). У больных раком желудка и толстой кишки

Таблица 3

Экспрессия CCR3 в инфильтративном компоненте опухолевого узла у больных раком желудка и толстой кишки

Экспрессия CCR3	Локализация опухоли; количество больных в а.ч. (%)			
	Рак желудка (n = 52)		Рак толстой кишки (n = 55)	
	С тканевой эозинофилией (n = 25)	Без тканевой эозинофилии (n = 27)	С тканевой эозинофилией (n = 23)	Без тканевой эозинофилии (n = 32)
Низкая	7 (28%)	17 (63%)	6 (26,1%)	17 (53,1%)
Высокая	18 (72%)	10 (37%)	17 (73,9%)	15 (46,9%)
	$\chi^2 = 6,385; p < 0,05; \phi = 0,350$		$\chi^2 = 2,986; p > 0,05$	

Таблица 4

Распределение полиморфных вариантов гена CCL11 (A384G) (в абсолютных числах и процентах) у больных раком желудка и толстой кишки

Группы сравнения	Генотипы			p ₁	Аллели		p ₂
	AA	AG	GG		A	G	
Больные раком желудка с эозинофилией (n = 100)	49 (49,0%)	37 (37,0%)	14 (14,0%)	>0,05; $\chi^2 = 1,37$	135 (67,5%)	65 (32,5%)	>0,05; $\chi^2 = 1,55$
Больные раком желудка без эозинофилии (n = 113)	63 (55,8%)	39 (34,5%)	11 (9,7%)		165 (73,0%)	61 (27,0%)	
Больные раком толстой кишки с эозинофилией (n = 104)	46 (44,2%)	47 (45,2%)	11 (10,6%)	>0,05; $\chi^2 = 2,13$	139 (66,8%)	69 (33,2%)	>0,05; $\chi^2 = 0,65$
Больные раком толстой кишки без эозинофилии (n = 110)	58 (52,7%)	39 (35,5%)	13 (11,8%)		155 (70,5%)	65 (29,5%)	

Примечание. Здесь и в табл. 5, 6 и 7: p₁ — уровень статистической значимости различий частоты генотипов между группами больных; p₂ — уровень статистической значимости различий частоты аллелей между группами больных; χ^2 — критерий Хи-квадрат Пирсона.

Таблица 5

Распределение полиморфных вариантов гена *CCR3* (*T51C*) (в абсолютных числах и процентах)
у больных раком желудка и толстой кишки

Группы сравнения	Генотипы			p ₁	Аллели		p ₂
	<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>CC</i>		<i>T</i>	<i>C</i>	
Больные раком желудка с эозинофилией (n = 100)	41 (41,0%)	40 (40,0%)	19 (19,0%)	<0,05; $\chi^2 = 6,57$	122 (61,0%)	78 (39,0%)	<0,05; $\chi^2 = 6,43$
Больные раком желудка без эозинофилии (n = 113)	60 (53,1%)	44 (38,9%)	9 (8,0%)		164 (72,6%)	62 (27,4%)	
Больные раком толстой кишки с эозинофилией (n = 104)	46 (44,2%)	41 (39,4%)	17 (16,3%)	<0,05; $\chi^2 = 7,45$	133 (63,9%)	75 (36,1%)	<0,05; $\chi^2 = 8,53$
Больные раком толстой кишки без эозинофилии (n = 110)	67 (60,9%)	35 (31,8%)	8 (7,3%)		169 (76,8%)	51 (23,2%)	

Таблица 6

Распределение полиморфных вариантов гена *IL5* (*C703T*) (в абсолютных числах и процентах)
у больных раком желудка и толстой кишки

Группы сравнения	Генотипы			p ₁	Аллели		p ₂
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>		<i>C</i>	<i>T</i>	
Больные раком желудка с эозинофилией (n = 100)	61 (61,0%)	34 (34,0%)	5 (5,0%)	<0,05; $\chi^2 = 6,30$	156 (78,0%)	44 (22,0%)	<0,05; $\chi^2 = 6,59$
Больные раком желудка без эозинофилии (n = 113)	52 (46,0%)	47 (41,6%)	14 (12,4%)		151 (66,8%)	75 (33,2%)	
Больные раком толстой кишки с эозинофилией (n = 104)	63 (60,6%)	32 (30,8%)	9 (8,6%)	<0,05; $\chi^2 = 7,36$	158 (76,0%)	50 (24,0%)	<0,05; $\chi^2 = 8,22$
Больные раком толстой кишки без эозинофилии (n = 110)	47 (42,7%)	45 (40,9%)	18 (16,4%)		139 (63,2%)	81 (36,8%)	

Таблица 7

Распределение полиморфных вариантов гена *IL5R* (*G80A*) (в абсолютных числах и процентах)
у больных раком желудка и толстой кишки

Группы сравнения	Генотипы			p ₁	Аллели		p ₂
	<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>		<i>G</i>	<i>A</i>	
Больные раком желудка с эозинофилией (n = 100)	59 (59,0%)	35 (35,0%)	6 (6,0%)	>0,05; $\chi^2 = 0,52$	153 (76,5%)	47 (23,5%)	>0,05; $\chi^2 = 0,52$
Больные раком желудка без эозинофилии (n = 113)	62 (54,9%)	42 (37,2%)	9 (7,9%)		166 (73,5%)	60 (26,5%)	
Больные раком толстой кишки с эозинофилией (n = 104)	61 (58,7%)	34 (32,7%)	9 (8,6%)	>0,05; $\chi^2 = 0,04$	156 (75,0%)	52 (25,0%)	>0,05; $\chi^2 = 0,05$
Больные раком толстой кишки без эозинофилии (n = 110)	62 (56,4%)	43 (39,1%)	5 (4,5%)		167 (75,9%)	53 (24,1%)	

выявлена положительная ассоциация гомозиготного генотипа *CC* (OR = 2,71 (1,16—6,31) и OR = 2,49 (1,03—6,05) соответственно), а также аллеля *C* (OR = 1,69 (1,13—2,53) и OR = 1,87 (1,23—2,85) соответственно) с эозинофильной инфильтрацией опухолевой ткани.

В результате проведенного генотипирования пациентов по полиморфизму *C703T* гена *IL5* установлено, что среди больных раком желудка и раком толстой кишки с эозинофилией статистически значимо чаще встречались носители гомозиготного генотипа *CC* и

аллеля *C*, реже — носители генотипа *TT* и аллеля *T* (табл. 6). Установлена положительная ассоциация гомозиготного генотипа *CC* (OR = 1,83 (1,06—3,17) и OR = 2,06 (1,19—3,55)) и аллеля *C* (OR = 1,76 (1,14—2,72) и OR = 1,84 (1,21—2,80)) с развитием опухолеассоциированной тканевой эозинофилии.

При исследовании полиморфизма *G80A* гена *IL5R* у больных раком желудка и толстой кишки достоверных различий в распределении аллелей и генотипов не выявлено. У всех пациентов независимо от

наличия тканевой эозинофилии преобладали гомозиготный генотип *CC* и аллель *G* (табл. 7).

Таким образом, развитие эозинофилии при злокачественных новообразованиях желудка и толстой кишки обусловлено носительством генотипа *CC* и аллеля *C* полиморфизма *T51C* гена *CCR3* и генотипа *CC* и аллеля *C* полиморфизма *C703T*.

Заключение

Формирование опухолеассоциированной тканевой эозинофилии при раке желудка и толстой кишки опосредованно действием эотаксина-1 и его рецептора вследствие высокой их экспрессии клетками опухоли. Результаты молекулярно-генетического исследования, отражающего ассоциацию генотипа *CC* и аллеля *C* полиморфизма *T51C* гена *CCR3* и генотипа *CC* и аллеля *C* полиморфизма *C703T* с наличием эозинофильной инфильтрации опухоли, указывают на генетически детерминированный характер эозинофилии при раке желудка и толстой кишки. Дальнейшее изучение эозинофил-активирующих факторов позволит более детально разобраться в механизмах развития опухолеассоциированной эозинофилии и понять роль эозинофилов в канцерогенезе.

References

1. Cho H., Lim S.J., Won K.Y., Bae G.E., Kim G.Y., Min J.W. et al. Eosinophils in colorectal neoplasms associated with expression of CCL11 and CCL24. *Journal of Pathology and Translational Medicine*. 2016; 50(1): 45-51.
2. Harbaun L., Pollheimer M.J., Kornprat P., Lindtner R.A., Vokemeyer C., Langner C. Peritumoral eosinophils predict recurrence in colorectal cancer. *Modern Pathology*. 2015; 28(3): 403-13.

3. Yankovich K.I., Dmitrieva A.I., Urazova O.I., Kolobovnikova Yu.V., Novitsky V.V., Purlik I.L. Tumor-associated eosinophilia. *Voprosy onkologii*. 2016; 62(4): 394-400. (in Russian)

4. Legrand F., Driss V., Delbeke M., Loiseau S., Hermann E., Dombrowicz D. et al. Human eosinophils exert TNF- α and granzyme A-mediated tumoricidal activity toward colon carcinoma cells. *Journal of Immunology*. 2010; 185(12): 7443-51.

5. Kolobovnikova Yu.V., Urazova O.I., Novitsky V.V. *The eosinophil in norm and pathology. [Eozinofil v norme i pri patologii]*. Tomsk: Pechatnaya manufaktura; 2014. (in Russian)

6. Freidin M.B., Puzyrev V.P., Ogorodova L.M., Kobvakova O.S., Kulmanakova I.M. Polymorphism of the interleukin- and interleukin receptor genes: population distribution and association with atopic asthma. *Russian Journal of Genetics*. 2002; 38(12): 1452-9.

7. Fukunaga K., Asano K., Mao X.Q., Gao P.S., Roberts M.H., Oguma T. et al. Genetic polymorphisms of CC chemokine receptor 3 in Japanese and British asthmatics. *The European Respiratory Journal*. 2001; 17(1): 59-63.

8. Ekinci S., Erbek S.S., Yurtcu E., Sahin F.I. Lack of association between eotaxin-1 gene polymorphisms and nasal polyposis. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2011; 145(6): 1036-9.

9. Mitrofanov K.Yu., Sazonova M.A. Association of point mutations in human nuclear and mitochondrial genome with coronary artery disease. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2012; 2: 51-5. (in Russian)

10. Pehlivanoglu B., Doganavsargil B., Sezak M., Nalbantoglu I., Korkmaz M. Gastrointestinal parasitosis: histopathological insights to rare but intriguing lesions of the gastrointestinal tract. *Turk Patoloji Dergisi*. 2016; 32(2): 82-90.

11. Gong D.H., Fan L., Chen H.Y., Ding K.F., Yu K.D. Intratumoral expression of CCR3 in breast cancer is associated with improved relapse-free survival in luminal-like disease. *Oncotarget*. 2016; 7(19): 28570-8.

12. Grijbovski A.M. Analysis of nominal data (independent observations). *Ekologiya cheloveka*. 2008; 6: 58-68. (in Russian)

Сведения об авторах:

Новицкий Вячеслав Викторович, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, зав. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, e-mail: kaf.pat.fiziolog@ssmu.ru

Колобовникова Юлия Владимировна, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, e-mail: kolobovnikova.julia@mail.ru

Дмитриева Алла Ивановна, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, зав. КДЛ ОГАУЗ «ТООД», e-mail: alladmitrieva@mail.ru

Уразова Ольга Ивановна, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, проф. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, e-mail: urazova72@yandex.ru

Пурлик Игорь Леонидович, доктор мед. наук, доцент, проф. каф. патологической анатомии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, зав. патологоанатомическим отделением ОГАУЗ «ТООД», e-mail: igor0812@rambler.ru

Кудряков Лев Александрович, канд. мед. наук, глав. врач ОГАУЗ «ТООД», e-mail: studio.leo@mail.ru

Чумакова Светлана Петровна, доктор мед. наук, доц. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, e-mail: chumakova_s@mail.ru

© Коллектив авторов, 2017
УДК 612.115.12

Березовская Г.А.^{1,2}, Клокова Е.С.², Петрищев Н.Н.^{1,2}

Генетические предикторы возобновления клиники ишемической болезни сердца после чрескожного коронарного вмешательства

¹ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава России, 197022, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова», 197341, Санкт-Петербург, ул. Акkuratова, 2

Гены тромбообразования и фолатного обмена играют важную роль в развитии и прогрессии ишемической болезни сердца (ИБС). Однако о возможной роли полиморфных маркеров в рецидиве ИБС после чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ) известно недостаточно. **Цель исследования:** Оценить роль генетических факторов системы тромбообразования и фолатного обмена (полиморфных маркеров генов *F5*, *F2*, *F13A1*, *PAI1*, *HPA1*, *MTHFR*, *FCB*), в возобновление клиники ИБС после ЧКВ. **Методика:** Исследование проводили с использованием выборки из 90 больных ИБС в возрасте от 40 до 75 лет: 75 пациентов после планового ЧКВ (60 мужчин и 15 женщин) и 15 лиц после экстренного ЧКВ (12 мужчин и 3 женщины). Молекулярно-генетическое исследование было выполнено с помощью комплекта реагентов «Сердечно-сосудистые заболевания СтрипМетод»® (ViennaLab Diagnostics GmbH, Австрия), выявляющие следующие варианты: *F5*, *F2*, *F13A1*, *PAI1*, *HPA1*, *MTHFR*, *FCB*. **Результаты:** В результате исследования была показана ассоциация полиморфного маркера *G103T (Val34Leu)* гена *F13A1* (фактор свертываемости крови 13, субъединица А1) с развитием рецидивирующего состояния ИБС после ЧКВ. Выявлены статистически значимые различия в распределении частот генотипов полиморфного маркера *Val34Leu* гена *F13A1*. Показано, что частота генотипа *Val/Val* у пациентов с осложнениями была выше, чем у пациентов без таковых: 0,700 и 0,400 соответственно ($\chi^2 = 7,78$; $p = 0,020$), при этом генотип *Val/Val* проявил себя как фактор риска развития осложнений: ОШ = 3,50 (95%ДИ 1,37—8,93). При сравнении аллелей выявили, что частота аллеля L у больных с осложнениями была ниже, чем у лиц без таковых: 0,167 и 0,375 соответственно ($p = 0,004$), и носительство аллеля L уменьшало вероятность развития осложнений: ОШ = 0,33 (95%ДИ 0,15—0,72). **Заключение:** Носительство варианта 34V гена *F13A1*, кодирующего А-субъединицу фактора свертывания 13, предрасполагает к возобновлению клинических проявлений ИБС после ЧКВ.

Ключевые слова: чрескожное коронарное вмешательство, гены тромбофилий, рестеноз и тромбоз внутри стента, ишемическая болезнь сердца, гемостаз.

Для цитирования: Березовская Г.А., Клокова Е.С., Петрищев Н.Н. Генетические предикторы возобновления клиники ишемической болезни сердца после чрескожного коронарного вмешательства. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 81—86. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8527

Для корреспонденции: Петрищев Николай Николаевич, доктор мед. наук, проф. каф. патологической физиологии, руководитель Центра лазерной медицины ПСПбГМУ, e-mail: lasmed@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 18.05.2017

Berezovskaya G.A.^{1,2}, Klokova E.S.², Petrishchev N.N.^{1,2}

Genetic predictors for symptoms recurrence in coronary artery disease after percutaneous coronary intervention

¹ I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Lva Tolstogo Str. 6-8, St. Petersburg 197022, Russia

² V.A. Almazov National Medical Research Center, Akkuratova Str. 2, St. Petersburg 197341, Russia

Genes of thrombosis and folate metabolism play an important role in development and progression of coronary artery disease (CAD). However, a possible role of polymorphic markers in CAD relapse following percutaneous coronary intervention (PCI) is not sufficiently understood. **Background.** Reports have indicated an association of genetic factors generally related with thrombophilia and recurrence of symptoms for coronary artery disease (CAD) following a percutaneous coronary intervention (PCI) due to restenosis and in-stent thrombosis. However, the relapse can also be caused by progression of atherosclerosis and endothelial dysfunction in unoperated blood vessels. **Aim:** To assess the role of genetic risk factors in-

involved in thrombosis and folate metabolism (polymorphic markers of *F5*, *F2*, *F13A1*, *PAI1*, *HPA1*, *MTHFR*, and *FCB* genes) in recurrence of CAD symptoms after PCI. **Methods:** The study included 90 patients with CAD aged 40—75; 75 of these patients had undergone elective PCI (60 men and 15 women) and 15 patients — emergency PCI (12 men and 3 women). Molecular genetic tests were performed using a CVD StripAssays® reagent kit (ViennaLab Diagnostics GmbH, Austria) to identify the following genetic variations: *F5*, *F2*, *F13A1*, *PAI1*, *HPA1*, *MTHFR*, and *FCB*. **Results:** The study results showed a significant association of the G103T (*Val34Leu*) polymorphism in the *F13A1* gene with relapses of IHD after PCI. Significant differences were found in genotype distribution frequencies of the *Val34Leu* polymorphism in the *F13A1* gene. The frequency of *Val/Val* genotype was higher in patients with complications than without complications, 0.700 and 0.400, respectively ($\chi^2 = 7.78$, $p = 0.020$). Furthermore, the *Val/Val* genotype can be classified as a risk factor for complications (OR = 3.50; 95% CI, 1.37—8.93). The L allele frequency was lower in patients with complications than in those without complications (0.167 and 0.375, respectively, $p = 0.004$), and carriage of the L allele reduced the likelihood of complications (OR = 0.33; 95% CI 0.15—0.72). **Conclusion:** Carriage of the 34V variant in the *F13A1* gene that encodes the coagulation factor XIII A subunit predisposes to a relapse of CAD symptoms after PCI.

Key words: percutaneous coronary intervention, genes of thrombophilia, restenosis and in-stent thrombosis, coronary heart disease, hemostasis.

For citation: Berezovskaya G.A., Klokoва E.S., Petrishchev N.N. Genetic predictors in recurrence of coronary artery disease symptoms after percutaneous coronary intervention. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(4): 81—86. (in Russian).

DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8527

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

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Berezovskaya G.A., <http://orcid.org/0000-0001-7854-5121>

Klokoва E.S., <https://orcid.org/0000-0003-3991-7740>

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

Received 18.05.2017

Введение

Генетические факторы развития сердечно-сосудистых заболеваний изучаются давно и плодотворно как за рубежом [1], так и в нашей стране [2—8].

Среди причин развития осложнений после чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ), одного из наиболее популярных методов лечения ишемической болезни сердца (ИБС), в последние годы рассматривают нарушения гемостаза, в том числе генетически обусловленные [9]. Многофункциональность большинства компонентов системы гемостаза позволяет предположить, что следствием данных нарушений может являться формирование внутри стента как тромбоза, так и рестеноза. В частности, не вызывает сомнения роль полиморфного варианта гена *F5*, кодирующего фактор V, в развитии осложнений после ЧКВ [9], тогда как о роли полиморфного варианта гена *PAI1*, кодирующего ингибитор активатора плазминогена 1, в развитии рестеноза внутри стента однозначного мнения пока нет [10].

В последние годы сохраняется интерес также и к другим причинам наследственных тромбофилий: полиморфным маркерам генов протромбина (*F2*) и ме-

тилететрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*) [11], способных повлиять на риск развития осложнений после ЧКВ. А информация о том, что нарушение перфузии миокарда при ИБС ассоциировано с полиморфными маркерами генов *PAI1*, β -полипептидной цепи фибриногена (*FCB*), факторов V, II, XIII [12], позволяет предположить, что данные генетические аномалии могут быть причастны и к развитию осложнений после эндоваскулярных вмешательств.

Цель исследования — оценить роль генетических факторов системы тромбообразования и фолатного обмена (полиморфных маркеров генов *F5*, *F2*, *F13A1*, *PAI1*, *HPA1*, *MTHFR*, *FCB*), в возобновлении клиники ИБС после ЧКВ.

Методика

В исследовании участвовали 90 больных ИБС в возрасте от 40 до 75 лет: 75 пациентов после планового ЧКВ (60 (80%) мужчин и 15 (20%) женщин) и 15 лиц после экстренного ЧКВ (12 мужчин (80%) и 3 (20%) женщины). Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежа-

щей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской Декларации. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова. До включения в исследование у всех участников было получено письменное информированное согласие. Инвазивная коронароангиография проводилась всем больным до или одновременно со стентированием коронарных артерий в экстренном или плановом порядке в условиях стационара НМИЦ им. В.А. Алмазова. Повторная коронароангиография проводилась в экстренном порядке больным при возникновении клиники острого коронарного синдрома, а также в плановом порядке в случае возобновления клиники стабильной стенокардии напряжения, положительного результата стресс-эхокардиографии и согласия пациента. В течение всего периода наблюдения, который составил 4 года, удалось отследить судьбу 79 человек (14 экстренных и 65 плановых больных).

Всем пациентам при поступлении в стационар проводили молекулярно-генетическое исследование с помощью комплекта реагентов «Сердечно-сосудистые заболевания СтрипМетод»® (ViennaLab Diagnostics GmbH, Австрия). Данный инновационный метод диагностики основан на мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР), мечении ПЦР-продуктов биотином, их гибридизации на тест-стрипе и визуализации с помощью фосфатазы. Использование специфических олигонуклеотидов, закрепленных на тест-стрипе, позволило детектировать следующие генетические варианты генов: *FV* (G1691A), *FV* (H1299R), *F2* (G20210A), *FGV* (-455G>A), *FXIII* (V34L), *PAI-1* (4G/5G), *HPA1* (1a/b), *MTHFR* (C677T), *MTHFR* (A1298C). Кровь у пациентов забирали в пробирки с ЭДТА. Геномную ДНК выделяли из цельной венозной крови твердофазным методом с помощью реагентов, входящих в состав вышеуказанного комплекта, в соответствии с инструкцией производителя. 100 мкл крови инкубировали с раствором для лизиса клеточных мембран, после чего производили сорбцию ДНК с помощью ионообменной смолы «GenXTRACT Resin». Полученный раствор ДНК использовали для постановки ПЦР.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью компьютерной программы Statistica 7.0 (StatSoft, США). Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,050$. Для сравнения частот генотипов и аллелей использовали непараметрические методы: критерий χ^2 , а для малых выборок (менее 10 наблюдений) — критерий χ^2 с поправкой Йетса. Отношение шансов (ОШ) рассчитывали с 95% доверительным интервалом (ДИ) по формуле $ОШ = (a \cdot d) / (b \cdot c)$, где *a* и *b* — количе-

ство больных, имеющих и не имеющих данный генетический вариант соответственно; *c* и *d* — количество лиц группы сравнения, имеющих и не имеющих данный генетический вариант соответственно.

Результаты и обсуждение

Анализ результатов наблюдений в течение четырёх лет после ЧКВ позволил установить, что по частоте возникновения рецидивов клиники ИБС статистически значимых различий между группами экстренных и плановых больных не было выявлено. Более половины случаев возобновления клиники ИБС в обеих группах приходилось на первый год наблюдения, что согласуется с результатами других исследований [13].

Результаты анализа генетических вариантов приведены в таблице. Статистически значимые результаты выявлены только полиморфного маркера *G103T* (*Val34Leu*) гена *F13A1* (фактор свертываемости крови 13, субъединица A1). Частота генотипа *VV* у пациентов с осложнениями была выше, чем у пациентов без осложнений: 0,700 и 0,400 соответственно ($\chi^2 = 7,78$; $p = 0,020$). При этом генотип *VV* проявил себя как фактор риска развития осложнений, о чём свидетельствует значение ОШ = 3,50 (95%ДИ 1,37—8,93). Напротив, частота аллеля *L* у больных с осложнениями была ниже, чем у лиц без осложнений: 0,167 и 0,375 соответственно ($p = 0,014$). У обследованных нами пациентов носительство аллеля *L* являлось защитным фактором, поскольку уменьшало вероятность развития осложнений: ОШ = 0,33 (95%ДИ 0,15—0,72).

Предотвращение интракоронарных осложнений после ЧКВ является одним из актуальных направлений генетической эпидемиологии. Исследования по выявлению генетических предикторов развития осложнений после эндоваскулярных вмешательств, такие, как GENDER (Genetic Determinants of Restenosis), CAPARES (Coronary AngioPlasty Amlodipine REStenosis Study), RESEARCH, ISAR-STEREO-2 (Strut thickness effect on restenosis outcome), позволили обнаружить ряд генетических вариантов, ассоциированных с развитием рестеноза и тромбоза внутри стента. К их числу относятся варианты генов регуляторов клеточного цикла (*CCNB1*, *p27kip1*, *eNOS*, *MIR-146a*, *TP53*), индукторов воспаления (*IL1B*, *IL1RN*, *IL8*, *IL18*, *TNF α* , *CD18*, *CD14*, *ICAM1*, *CX37*), окислительного стресса (*RAGE*, *eNOS*, *HO1*), системы гемостаза (*FV*, *FGV*, *GPX1*, *PAI1*, *P2RY12*), регуляторов обменных процессов (*ALOX5AP*, *VDR*, *ESR1*, *MTHFR*, *ADIPOQ*, *UPC3*, *FBC*, *MMP12*, *ACE*, *AGTR1*) и эпигенетических регуляторов экспрессии генов (*KAT2B*) [1].

Наиболее хорошо изучено влияние гена *PAI-1* на развитие рестеноза внутри стента, хотя результаты этих исследований не всегда сопоставимы. Например, изучение роли данного гена в развитии позднего рестеноза внутри стента у курящих и некурящих пациентов позволило сделать вывод о том, что факт курения у носителей генотипа *5G/5G* способствует значительно повышению риска развития позднего рестеноза внутри стента; генотип *4G/5G*, напротив, снижает этот риск до уровня некурящих пациентов [14]. По мнению других авторов, ассоциация между носительством генотипа *4G/5G* гена *PAI-1* и развитием рестеноза и тромбоза внутри стента отсутствует [15]. Однако подтверждение роли белка *PAI-1* в развитии рестеноза внутри стента, позволяющей использовать оценку активности данного фермента для расчёта риска развития указанного осложнения [16], заставляет усомниться в отсутствии влияния его гена. Данное предположение подтверждают результаты другого исследования, в котором было установлено, что носительство генотипов *4G/5G* и *5G/5G* гена *PAI1* повышает риск развития рестеноза внутри стента у больных в иранской популяции [10].

Поскольку развитие осложнений после ЧКВ (рестеноза и тромбоза внутри стента) протекает с участием компонентов системы гемостаза и элементов стенки атеросклеротически изменённого сосуда, в нашем исследовании были проанализированы частоты носительства вариантов генов, роль которых в указанных процессах обсуждается в настоящее время наиболее активно.

Наши результаты свидетельствуют о том, что обследованные группы различаются только по распределению вариантов *V34L* гена XIII фактора. Известно, что данный вариант обусловлен однонуклеотидной заменой *G103T* в гене, кодирующем *A1*-субъединицу фактора свертываемости крови *13*, в результате которой происходит замещение валина на лейцин в позиции 34 белкового продукта гена (*Val34Leu*). Это приводит к снижению прокоагулянтного эффекта

фактора XIII, трансглутаминазной функцией которого обладает только его активная форма (фактор XIIIa), образующаяся путем частичного протеолиза *A*-субъединицы под действием тромбина с высвобождением «пептида активации» (*AP* — activation peptide) на последней стадии коагуляционного каскада.

Полученные нами данные, демонстрирующие повышенную частоту генотипа *VV* в группе больных с рецидивами клиники ИБС после ЧКВ, а также повышенную частоту аллеля *L* в группе благоприятного течения послеоперационного периода, согласуются с результатами исследования Gemmati D. et al. (2007) [17]. В данном исследовании было установлено, что частота развития неблагоприятных событий после первичной ЧКВ при инфаркте миокарда (ИМ) в группе носителей генотипа *VV* была в 2 раза выше по сравнению с группой без осложнений. Напротив, среди больных с благоприятным течением послеоперационного периода выше оказалась частота варианта *L*, который, по мнению авторов, способствует повышению выживаемости больных после ИМ [17].

Для активации формы *Leu34Leu* фактора XIII необходимо воздействие меньших доз тромбина, но с более высокой скоростью, чем для «нормальной» формы прокоагулянта *Val34Val* [18]. Установлено, что вследствие этой аминокислотной замены происходит изменение кинетики образования и структуры фибринового сгустка, о чём свидетельствуют результаты тромбоэластографии и электронной микроскопии [18, 19]. Недавно опубликованные данные свидетельствуют также и о том, что увеличение фибринолитической активности фактора XIII связано со способностью замены *V34L* влиять на формирование поперечных сшивок (cross-linking) при формировании прижизненного фибринового сгустка у мышей [20].

Однако, несмотря на то, что в литературе имеется немало данных о протективном действии варианта *34Leu* как для артериальных, так и для венозных тромбозов, пока нет однозначного мнения о роли по-

Таблица

Распределение генотипов и аллелей в обследованных выборках больных ИБС

Полиморфный маркер	Генотип, аллель	Частота генотипа, аллеля (число носителей)		χ^2	p	ОШ	
		С возобновлением клиники ИБС (n = 30)	Без возобновления клиники ИБС (n = 60)			знач.	ДИ95%
<i>F13A1 Val34Leu</i>	<i>Val/Val</i>	0,700 (21)	0,400 (24)	7,78	0,02	3,50	1,37 — 8,93
	<i>Val/Leu</i>	0,267 (8)	0,450 (27)			0,44	0,17 — 1,16
	<i>Leu/Leu</i>	0,033 (1)	0,150 (9)			0,20	0,02 — 1,62
	<i>Val</i>	0,833 (50)	0,625 (75)	8,18	0,004	3,00	1,38 — 6,50
	<i>Leu</i>	0,167 (10)	0,375 (45)			0,33	0,15 — 0,72

лиморфизма *Val34Leu* фактора XIII в развитии тромботических осложнений [21, Капустин С.И., 2006]. Например, необъяснимым остаётся факт высокой транскламиназной активности фактора XIII у больных ИМ [22].

Опубликованные по результатам исследования GENDER данные свидетельствуют о том, что Leiden-полиморфизм гена фактора V (1691 G->A), хорошо известный фактор риска венозных тромбозов, способен даже уменьшить риск развития рестеноза внутри стента [23]. В связи с этим было высказано предположение о том, что влияние указанного полиморфизма на снижение риска развития рестеноза внутри стента может быть связано с наличием не связанных с гемостазом эффектов у протеина C, активность которого возрастает у носителей мутации FV Leiden [9].

Результаты исследований отечественных учёных А.А. Дашковой и Г.А. Чумаковой [24] демонстрируют наличие взаимосвязи носительства определённых вариантов генов системы гемостаза и фолатного цикла с развитием рестенозов у пациентов с ИБС после ЧКВ. В частности, было установлено, что носительство генотипа GA и аллеля A гена *F2 (20210G/A)*, генотипа GA и аллеля A гена *FV (Arg506Gln)*, генотипа 4G/4G и аллеля 4G гена *SERPINE1 (675 4G/5G)*, а также аллеля T гена *MTHFR (C677T)* у мужчин, подвергшихся ангиопластике со стентированием коронарных артерий стентами без лекарственного покрытия, увеличивает риск развития рестеноза коронарных артерий в течение первого года после вмешательства [24]. Однако в нашем исследовании не было выявлено связи между возобновлением клиники ИБС после ЧКВ и носительством вышеуказанных генетических вариантов.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что рецидивы ИБС связаны не только с изменением анатомии коронарного кровотока, но и с генетическими особенностями индивидуума. Генетическая предрасположенность к возобновлению клинических проявлений ИБС после ЧКВ обусловлена как наличием мутаций в генах, кодирующих образование факторов свёртывания, так и с отсутствием генетических вариантов, обладающих защитным эффектом, что свидетельствует о необходимости продолжения исследований в этой области.

References

1. Dai X., Wiernek S., Evans J.P. et al. Genetics of coronary artery disease and myocardial infarction. *World J Cardiol.* 2016; 8 (1):1-23. doi:10.4330/wjc.v8.i1.1.
2. Nikitin A.G., Chudakova D.A., Spitsina E.V. et al. Association of GNB3 gene C825T polymorphism with coronary heart disease. *Genetika.* 2007; 43 (8): 1129-33. (in Russian)

3. Kulikov I.V., Lozhkina N.G., Maksimov V.N. et al. Genetic markers of the severity of coronary artery in patients with acute coronary syndrome. *Byulleten' SO RAMN* 2013, 33(4): 65-69. (in Russian)

4. Shesternja P.A., Nikulin S.Y., Shulman V.A. et al. Genetic predictors of myocardial infarction in subjects of young age. *Kardiologiya. (Rus)* 2013; 53 (7): 4-8. (in Russian)

5. The genetic passport — the basis of individual and predictive medicine / Ed. VS Baranov. — SPb.: Publishing house of the N-L, 2009. — 528 p.

6. Golubenko M.V., Stepanov V.A., Makeeva O.A. et al. DNA chip for the study of the structure of hereditary predisposition to cardiovascular disease. *Molekuljarno- biologicheskie tehnologii v medicinskoj praktike* 2009; 13: 42-49. (in Russian)

7. Sukhinina TS, Shakhnovich RM, Barsova RM et al. Value of allele gene polymorphism of the inflammation system for prognosis of patients with myocardial infarction. *Kardiologiya.* 2012; 52 (3):15-22. (in Russian)

8. Zykov M.V., Zykova D.S., Kashtalov V.V. et al. The prognostic value of peripheral arteries diseases in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Ateroskleroz.* 2012; 8 (1): 14-21. (in Russian)

9. Pons D., Monraats P.S., de Maat M.P. et al. The influence of established genetic variation in the haemostatic system on clinical restenosis after percutaneous coronary interventions. *Thromb Haemost.* 2007; 98(6):1323-28. doi:10.1160/TH07-04-0301

10. Aslanabadi N., Monfaredan A., Niaei G. et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and restenosis events after coronary stent placement in Iranian Azari patients. *Ulutas Gen Res J.* 2016; 1(1): 11-17. doi: 10.5455/ugrj.20160210063642.

11. Zavalloni D., Presbitero P., Lodigiani C. et al. Prevalence of inherited thrombophilia in patients with documented stent thrombosis. *Circ J.* 2012; 76(8):1874-79. doi: 10.1253/circj.CJ-11-1358

12. Satra M., Samara M., Wozniak G. et al. Sequence variations in the FII, FV, F13A1, FGB and PAI-1 genes are associated with differences in myocardial perfusion. *Pharmacogenomics.* 2011; 12(2):195-203. doi: 10.2217/pgs.10.180.

13. Kufner S., Cassese S., Valeskini M. et al. Long-Term Efficacy and Safety of Paclitaxel-Eluting Balloon for the Treatment of Drug-Eluting Stent Restenosis: 3-Year Results of a Randomized Controlled Trial. *JACC Cardiovasc Interv.* 2015; 8(7):877-84. doi: 10.1016/j.jcin.2015.01.031.

14. Ortlepp JR., Hoffmann R., Killian A., Lauscher J., Merkelbach-Brese S., Hanrath P. The 4G/5G promotor polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene and late lumen loss after coronary stent placement in smoking and nonsmoking patients. *Clin Cardiol.* 2001; 24(9):585-91.

15. Bottiger C., Koch W., Lahn C., Mehili J., von Beckerath N., Schomig A., Kastrati A. 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene and risk of restenosis after coronary artery stenting. *Am Heart J.* 2003; 146(5):855-61.

16. Katsaros K.M., Speidl W.S, Kastl SP, Zorn G., Huber K., Maurer G., Glogar D., Wojta J., Christ G. Plasminogen activator inhibitor-1 predicts coronary in-stent restenosis of drug-eluting stents. *J Thromb Haemost.* 2008 Mar; 6(3):508-13. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02884.x.

17. Gemmati D., Federici F, Campo G, Tognazzo S, Serino ML, De Mattei M, Valgimigli M, Malagutti P, Guardigli G, Ferraresi P, Bernardi F, Ferrari R, Scapoli GL, Catoz-

zi L. Factor XIII A-V34L and factor XIII B-H95R gene variants: effects on survival in myocardial infarction patients. *Mol Med*. 2007 Jan-Feb; 13(1-2):112-20.

18. Ariens R.A.S., Philippou H., Nagaswami C. et al. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood*. 2000; 96: 988-995.

19. Schroeder V., Chatterjee T., Kohler H.P. Influence of blood coagulation factor XIII and FXIII Val34Leu on plasma clot formation measured by thromboelastography. *Thromb. Res*. 2001; 104: 467-74.

20. Duval C., Ali M., Chaudhry W.W. et al. Factor XIII A-Subunit V34L Variant Affects Thrombus Cross-Linking in a Murine Model of Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016 Feb;36(2):308-16. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306695.

21. Kapustin S.I. Hereditary thrombophilia as a polygenic pathology. *Tromboz, Gemostaz i Reologia*. 2006; 2 (26): 24-34.

22. Bray P.F. Integrin polymorphisms as risk factors for thrombosis. *Thromb. Haemost.* 1999; 82: 337- 44.

23. Verschuren J.J.W., Trompet S., Postmus I. Systematic Testing of Literature Reported Genetic Variation Associated with Coronary Restenosis: Results of the GENDER Study. *PLoS One*. 2012; 7(8): e42401. doi: 10.1371/journal.pone.0042401

24. Dashkova A.A., Chumakov G.A. The role of polymorphisms of some genes hemostasis systems and folate cycle in the occurrence of restenosis in patients with chronic coronary heart disease after coronary stenting. *Vestnik Rossijskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2012, 1:115-116.

Сведения об авторах:

Березовская Гелена Анатольевна — канд. мед. наук, ассистент кафедры факультетской терапии ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, ст. науч. сотр. НИЛ ОКС НМИЦ им. В.А. Алмазова, e-mail: berezovgel@mail.ru.

Клокова Елена Сергеевна — науч. сотр. НИЛ УЗМИ НМИЦ им. В.А. Алмазова. e-mail: el-se-k@mail.ru

Петрищев Николай Николаевич — доктор мед. наук, проф. каф. патологической физиологии, руководитель Центра лазерной медицины ПСПбГМУ им. академ. И.П. Павлова. e-mail: lasmed@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092

Тодосенко Н.М.¹, Юрова К.А.¹, Хазиахматова О.Г.¹, Малинина И.П.², Литвинова Л.С.¹

Влияние дексаметазона на процессы активации и созревания CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ Т-клеток при ревматоидном артрите *in vitro*

¹ ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта», 236016, г. Калининград, Россия, ул. Боткина, д. 3

² ГБУЗ «Областная клиническая больница Калининградской области», 236019, г. Калининград, Россия, ул. Клиническая, д. 74

Цель — исследование влияния глюкокортикоида дексаметазона (Dex) на процессы активации и генерации терминально-дифференцированных эффекторных CD4⁺ Т-лимфоцитов (TEMRA) в культурах CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток в условиях, имитирующих стимуляцию Т-клеточного рецептора *in vitro* в норме и при ревматоидном артрите (РА). **Методика.** Исследовали мононуклеарные лейкоциты (МНК) из венозной гепаринизированной крови 50 пациентов с ревматоидным артритом. Методом проточной цитофлуориметрии проанализировано изменение иммунофенотипа Т-лимфоцитов; иммуноферментным анализом оценена секреция CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетками цитокина IL-2; методом полимеразной цепной реакции определена экспрессия мРНК генов *hTERT*, *U2af114* и *Gfi1* в CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетках. **Результаты.** Полученные данные демонстрируют, что *in vitro* на фоне TCR-активации CD3⁺CD45RO⁺ культур Т-клеток, Dex (в разной степени выраженности) участвует в формировании субпопуляции терминально-дифференцированных эффекторов (CD3⁺CD4⁺CD45RO⁻CD28⁻ TEMRA), характеризующихся низкой теломеразной активностью, потерей молекул костимуляции (CD28) и активации (CD25) и реэкспрессирующих высокомолекулярную изоформу рецептора CD45 — CD45RA в норме и у больных РА. **Заключение.** Сделано заключение, что популяция CD3⁺CD4⁺CD45RO⁻CD28⁻ лимфоцитов является ключевым участником в патогенезе РА, ускоренно приобретающая свой негативный потенциал на фоне глюкокортикоидной терапии, способствуя прогрессии заболевания, в частности, за счет мощного выброса провоспалительных медиаторов.

Ключевые слова: Т-клетки памяти; ревматоидный артрит; глюкокортикоидный гормон; дексаметазон; активация; дифференцировка; созревание.

Для цитирования: Тодосенко Н.М., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Малинина И.П., Литвинова Л.С. Влияние дексаметазона на процессы активации и созревания CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ Т-клеток при ревматоидном артрите *in vitro*. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 87—97.

DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8528

Для корреспонденции: Литвинова Лариса Сергеевна, доктор мед. наук, зав. лаб. иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, e-mail: larisalitvinova@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности («дорожной карты») и субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/6.7» Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Поступила 22.06.2017

Todosenko N.M.¹, Yurova K.A.¹, Khaziakhmatova O.G.¹, Malinina I.P.², Litvinova L.S.¹

The *in vitro* effect of dexamethasone on maturation and differentiation of CD4⁺CD45RO⁺ T-cells in rheumatoid arthritis

¹ Immanuel Kant Baltic Federal University, Botkina Str. 3, Kaliningrad 236016, Russia

² Regional Clinical Hospital, Klinicheskaya Str. 74, Kaliningrad 236019, Russia

Aim. To study the effect of dexamethasone (Dex) on activation and generation of terminally differentiated effector CD4⁺ T-lymphocytes (TEMRA) in cultured CD3⁺CD45RO⁺ T cells under the conditions mimicking stimulation of the T-cell receptor *in vitro* as it occurs in health and rheumatoid arthritis (RA). **Methods.** The study was performed on mononuclear leukocytes isolated from heparinized venous blood of 50 patients with rheumatoid arthritis. Changes in the T-lymphocyte immunophenotype were detected using flow cytometry. Secretion of cytokine IL-2 by CD3⁺CD45RO⁺ cells was assessed by ELISA. Expression of *hTERT*, *U2af114*, and *Gfi1* gene mRNA in CD3⁺CD45RO⁺ T cells was measured by polymerase chain reaction. **Results.** During the *in vitro* TCR activation of cultured CD3⁺CD45RO⁺ T cells, Dex participated to a variable extent in formation of a subpopulation of terminally differentiated effectors (CD3⁺CD4⁺CD45RO⁻CD28⁻ TEMRA), which are characterized by low telomerase activity, loss of costimulation (CD28) and activation (CD25) molecules, and

re-expression of the high molecular weight CD45-CD45RA receptor isoform both in healthy individuals and RA patients. **Conclusion.** The population of CD3⁺CD4⁺CD45RO⁻CD28⁻ lymphocytes is a key participant in the pathogenesis of RA by accelerating their negative impact during the glucocorticoid therapy. This lymphocyte population contributes to RA progression particularly due to the powerful discharge of proinflammatory mediators.

Keywords: memory T-cells; rheumatoid arthritis; glucocorticoid hormone; dexamethasone; activation; differentiation; maturation.

For citation: Todosenko N.M., Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Malinina I.P., Litvinova L.S. The *in vitro* effect of dexamethasone on maturation and differentiation of CD4⁺CD45RO⁺ T-cells in rheumatoid arthritis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(4): 87–97. (in Russian). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8528

For correspondence: Larisa S. Litvinova, Dr. Sci. Med., Head of Laboratory immunology and cells biotechnology of Immanuel Kant Baltic Federal University. E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

Conflict of interests. The authors state that there is no conflict of interest.

Acknowledgment. Work is performed under the program of increase of competitiveness («road maps») and subsidies «Organization of scientific research 20.4986.2017/6.7» Immanuel Kant Baltic Federal University.

Information about authors:

Todosenko N.M., <http://orcid.org/0000-0001-7468-4861>

Yurova K.A., <http://orcid.org/0000-0001-6146-3330>

Malinina I.P., <http://orcid.org/0000-0001-7068-8208>

Litvinova L.S., <http://orcid.org/0000-0001-5231-6910>

Received 22.06.2017

Введение

Ревматоидный артрит (РА) — хроническое мультисистемное аутоиммунное заболевание, характеризующееся стойким синовиальным воспалением, приводящим к хрящевой и костной деструкции [1, 2]. Основными участниками патологического процесса при РА являются аутореактивные CD4⁺ Т-лимфоциты [3, 4], продуцирующие провоспалительные факторы [1], имеющие признаки репликативного старения [5] и терминальной дифференцировки [3, 4, 6].

Общепринято, что процессы дифференцировки и созревания Т-клеток тесно ассоциированы с молекулой CD45 — критическим регулятором их функциональной активности [7]. Изоформы молекулы CD45, генерированные путем альтернативного сплайсинга экзонов, отражают процесс дифференцировки Т-клеток во время антигензависимой активации иммунокомпетентных клеток и обладают разными свойствами при взаимодействии с лигандом [8]. Предполагают, что регуляция механизма альтернативного сплайсинга гена *Ptprc* (кодирующего молекулу CD45), индуцированная стимуляцией агентами инфекционной и неинфекционной природы, осуществляется за счет изменения активности генов — *U2af1l4* и *Gfi1*, что, в конечном итоге, находит отражение в конверсии фенотипа Т-клеток и свидетельствует об процессах их дифференцировки и созревания [9].

Синтетические аналоги глюкокортикоидных гормонов (ГК) занимают лидирующее место среди ле-

карственных препаратов, направленных на снижение воспалительной реакции организма при аутоиммунных заболеваниях, в частности, при РА [10, 11]. Однако долгосрочное воспаление при АИЗ в сочетании с ГК терапией может способствовать развитию системных осложнений и коморбидных патологий, затрудняющих реабилитацию и приводящих к инвалидизации этой категории пациентов, значительно сокращая продолжительность их жизни [12, 13]. Кроме того, частые рецидивы РА на фоне терапии ГК [14] позволили предположить их участие в формировании пула аутореактивных терминально-дифференцированных Т-клеток, усугубляющих течение аутоиммунного процесса. В представленной работе в системе *in vitro* была проведена оценка влияния ГК дексаметазона (Dex) на процессы активации и созревания TCR-стимулированных CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ Т-клеток в норме и при РА.

Методика

Исследование проводилось согласно Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., получено разрешение локального этического комитета при БФУ им. И. Канта №2 от 11 ноября 2014 г. Материалом для исследования служили мононуклеарные лейкоциты (МНК), выделенные из венозной гепаринизированной крови, полученной от 50 больных ревматоидным артритом (РА) (38 жен-

щин и 12 мужчин в возрасте $36,4 \pm 7,2$ года) и 20 условно здоровых доноров — 10 женщин и 10 мужчин в возрасте $35,3 \pm 8,9$ года. Верификация диагноза ревматоидного артрита была выполнена согласно приказу №21 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным ревматоидным артритом» от 13 января от 2006 г. Группы обследованных лиц были сопоставимы по возрастным и гендерным характеристикам, со всеми пациентами было подписано добровольное информационное согласие на исследование.

*Выделение МНК из цельной крови.
Сепарация CD3⁺CD45RO⁺ лимфоцитов*

Выделение мононуклеарных клеток (МНК) проводили методом центрифугирования на фиколл-урографинном градиенте (плотность 1.077 г/см^3 , Schering, Испания и Pharmacia, Швеция) по стандартной методике. Культуры CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток из МНК получали методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS® (MidiMACS Separator, LS Columns, MiltenyiBiotec, Германия) и моноклональных антител к CD14 и CD45RO с парамагнитными частицами (MicroBeads human, Miltenyi Biotec, Германия), согласно протоколу фирмы-изготовителя. Подсчёт числа клеток в полученных культурах проводили с помощью автоматического счётчика клеток (Countess™ Automated Cell Counter, Invitrogen, США), используя краситель трипановый синий (0,4%, Invitrogen, США). Использовали клеточные культуры, чистота которых после магнитной сепарации составляла в среднем $97,5 \pm 2,12\%$ (фенотип CD3⁺CD45RO⁺CD14⁻CD19⁻) (далее, CD3⁺CD45RO⁺- клетки). Число живых клеток в культурах составляло не менее 98%.

Культивирование CD3⁺CD45RO⁺-лимфоцитов

CD3⁺CD45RO⁺-клетки (10^6 кл/мл) культивировали в 48-луночной планшете в бессывороточной среде Искова (Sigma, США) в присутствии синтетического ГК (Dex) (Ogion Pharma, Россия) в разных концентрациях или без него (контроль) с добавлением антибиотитиновых частиц, конъюгированных с антителами к CD2, CD3, CD28 (T-Cell Activation/Expansion Kit human, Miltenyi Biotec, Германия) (далее Ac/Exp) при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂ в течение 48 ч. Реагент Ac/Exp добавляли в пробы в количестве 5 мкл, которые содержали — $0,5 \cdot 10^6$ анти-биотиновых MACSiBead™ частиц; соотношение клеток и активирующих частиц составило 1:2.

Варианты культивирования: 1) в среде без добавок (контроль); 2) в среде, содержащей Ac/Exp; 3) в среде, содержащей Ac/Exp ($0,5 \cdot 10^6$ MACSiBead™ частиц) и Dex (2; 8; 16; 32; 64 мг). Дозы ГК, используемые в эксперименте были определены, ис-

ходя из математической фармакокинетической двухкамерной модели, где учитывался расчётный объём распределения ГК в организме (т.е. гипотетический объём жидкости организма (Vd), в котором лекарственное вещество распределено равномерно и находится в концентрации, равной концентрации (Q) данного вещества в плазме крови (C_p ; $Vd = Q/C_p$; для ГК величина Vd составляет $\sim 0,35 \text{ л/кг}$). Таким образом, добавляемые нами концентрации Dex на 1 млн культивируемых Т-клеток/мл, составили (10^{-6}M ; $2 \cdot 10^{-6}\text{M}$; $4 \cdot 10^{-6}\text{M}$; $8 \cdot 10^{-6}\text{M}$; $1,6 \cdot 10^{-5}\text{M}$), что соответствует действию Dex в концентрациях 2; 8; 16; 32; 64 мг/мл, распределённых условно в 5 л крови.

Имуноферментный анализ

Содержание IL-2 в супернатантах культур CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток оценивали методом иммуноферментного анализа с использованием стандартного набора реактивов, согласно протоколу фирмы-производителя («Вектор-Бест», Россия) на приборе Microplate Reader 680 (Bio-Rad, США).

Проточная лазерная цитометрия

Регистрацию жизнеспособности и подсчёт числа клеток в клеточных культурах проводили методом проточной лазерной цитометрии на цитофлюориметре Guava EasyCite Plus (Millipore, США) с использованием реагента Guava ViaCount и одноименной программы (Millipore, США) согласно протоколу производителя. Число клеток, несущих поверхностные маркеры (CD45RO, CD3, CD4, CD28, CD25, CD71) определяли методом проточной лазерной цитометрии с помощью моноклональных антител, конъюгированных с Viablue (CD45RO); аллофикоцианином (APC; CD3) (Miltenyi Biotec, Германия); фикоэритрином (PE; CD4) (Abcam, Cambridge, Великобритания); с конъюгатом PE с цианином (PE-Cy7; CD25, CD71) (e-Bioscience, США) согласно методикам производителя. Регистрацию результатов проводили на проточном цитофлюориметре MACSQuant («Miltenyi Biotec», Германия). Все результаты цитометрического анализа оценивали с помощью программы KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США).

*Выделение общей РНК
из CD3⁺CD45RO⁺-лимфоцитов.
Проведение обратной транскрипции.
Постановка ПЦР-реакции*

После инкубации клеточных культур тотальную РНК выделяли с использованием водного раствора фенола и гуанидин-изотиоцианата (ExtractRNA kit «Евроген», Россия), согласно протоколу производителя. Обратную транскрипцию проводили с исполь-

зованием набора реагентов MMLV RT kit («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. В качестве затравки использовали олигонуклеотидный праймер (oligo(dT23), 20 мкМ) («Бигль», Россия). Для определения уровней относительной экспрессии генов проводили мультиплексный анализ ПЦР с использованием специфичных зондов TaqMan («Бигль», Россия). ПЦР проводили с использованием реагентов qPCRMixHS («Евроген», Россия) и праймеров, в концентрации 10 пМ. В качестве матрицы использовали 4 мкл кДНК, в качестве референсного гена — ген GAPDH.

Предварительную оценку специфичности праймеров, ампликонов и зондов проводили с помощью on-line программы BLAST.

Использовали следующие олигонуклеотидные праймеры:

GFI1_for 5'-TGGAGCAGCACAAAGCC-3'
 GFI1_rev 5'-GACAGTGTGGATGACCTCTTG-3'
 GFI1_probe FAM-5'-CGCAGGAACGGAGCTTTGACTGTA-3'~BHQ-1 (зонд)
 U2af114_for 5'-CTTACAACAAGCCGACATTC-3'
 U2af114_rev 5'-CAAGGTTGTCGCACACATTC-3'
 U2af114_probe FAM-5'-CCAGGAGGTGTTACAGAACTGCA-3'~BHQ-1 (зонд)
 TERT_for 5'-TGACACSTCACSTCACCCACC-3'
 TERT_rev 5'-CACTGTCTTCCGCAAGTTCACC-3'
 TERT_probe FAM-5'-ACCSTGGTCCGAGGTGTCCCTGAG-3'~BHQ-1 (зонд)
 GAPDH_for 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
 GAPDH_rev 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'
 GAPDH_probe HEX-5'-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3'~BHQ-1 (зонд)

ПЦР-реакцию проводили в 3 повторах с использованием амплификатора LightCycler 480 Real-Time PCR («Roche», Швейцария). Температура плавления продукта амплификации определялась индивидуально для каждой пары праймеров, при анализе кривой плавления. Расчеты уровней относительной экспрессии исследуемых генов производили с помощью модифицированной формулы Пфаффа для разных эффективностей амплификации. В нашем случае эффективность реакции (E) была равна 2.

$$\text{Относительный уровень экспрессии} = \frac{\text{Еиссл}^{\Delta\text{СРиссл(контр-иссл)}}}{\text{Ереф}^{\Delta\text{СРреф(контр-иссл)}}$$

Статистическая обработка полученных результатов

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences). Оценку полученных результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических гипотез. При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (Колмогорова—Смирнова). Для каждой выборки вычисляли средневывборочные характеристики: медиану (Me), первый и третий квартили (Q₁, Q₃). Для оценки статистической значимости различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали критерии Вилкоксона (для зависимых выборок) и Манна—Уитни (для независимых выборок). С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный (путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r)) и регрессионный (с вычислением коэффициента регрессии — r²) анализы. Различия считались значимыми при p < 0,05.

Результаты и обсуждение

По окончании срока инкубации (48 ч) в интактных культурах CD3⁺CD45RO⁺ лимфоцитов здоровых доноров число CD4⁺ клеток, несущих поверхностные молекулы CD28, CD25 и CD71, а также содержание IL-2 в супернатантах исследуемых культур статистически значимо превышали аналогичные показатели больных РА (таблица, рис. 1). Содержание CD3⁺CD4⁺CD28⁺CD45RO⁻ лимфоцитов оказалось выше в культурах больных РА.

Добавление в среду культивирования TCR-активатора (Ac/Exp) сопровождалось статистически значимым увеличением числа CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ клеток, несущих маркеры активации (CD25) и пролиферации (CD71), ростом содержания IL-2 в супернатантах исследуемых культур; тогда как количество CD4⁺CD28⁺ лимфоцитов статистически значимо снижалось в обеих группах по сравнению с интактными значениями (таблица). Активация способствовала статистически значимому росту числа CD3⁺CD4⁺CD28⁻CD45RO⁻ клеток в культурах здоровых доноров и больных РА (таблица). Действие TCR-активатора инициировало снижение уровня экспрессии мРНК гена *hTERT* в CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитах (в 3,7 раза в культурах здоровых до-

норов, в 23,5 раза — больных РА) (рис. 1, рис. 3). Анализ транскрипции мРНК генов (*Gfi1* и *U2af114*), регулирующих альтернативный сплайсинг гена *PTPRC* (кодирующего молекулу CD45), позволил выявить увеличение их экспрессии более чем в 2 раза у больных РА, тогда как в культурах здоровых доноров регистрировалось резкое угнетение транскрипции мРНК гена *U2af114* (более чем в 35 раз), а уровень экспрессии мРНК гена *Gfi1* был сопоставим с контрольным (рис. 2, рис. 4).

Сочетанное действие TCR-активатора и Dex привело к дозозависимому снижению числа CD4⁺ T-кле-

ток, экспрессирующих молекулы — CD25 и CD71 в обеих группах исследования ($p < 0,05$), тогда как содержание CD3⁺CD4⁺CD28⁺CD45RO⁻ T-лимфоцитов значительно увеличивалось в обеих группах (таблица). Следует отметить существенно более высокие значения изучаемого показателя в пробах больных РА, по сравнению с образцами здоровых доноров. Комбинация Ac/Exp и Dex во всем диапазоне концентраций приводила к снижению концентрации IL-2 в супернатантах клеточных культур обеих групп (рис. 1).

Уровень экспрессии мРНК гена каталитической субъединицы теломеразы *hTERT* снижался в культу-

Таблица

Содержание CD4-позитивных клеток (%), экспрессирующих молекулы CD25, CD71, CD28, CD45RO⁻ в культурах CD3⁺CD45RO⁺ лимфоцитов, полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, на фоне TCR-стимуляции, в условиях инкубации с разными концентрациями дексаметазона (Dex)

Показатель	Условия культивирования		Здоровые доноры	Больные РА
CD4 ⁺ CD25 ⁺	Без активации		3,11 (2,99—3,14)	1,95 (1,60—2,70)
	Ac/Exp		35,22 (30,19—36,29)*	25,13 (15,75—27,52)*
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	35,92 (30,79—37,02)**	19,75 (13,48—23,08)**
		8	34,87 (29,89—35,93)**	19,48 (12,70—22,18)**
		16	26,68 (22,87—27,49)**	15,58 (9,85—17,54)**
		32	21,35 (18,29—21,99)**	16,37 (10,87—19,87)**
	64	22,15 (18,99—22,82)**	12,78 (9,05—15,80)**	
CD4 ⁺ CD71 ⁺	Без активации		4,70 (4,58—5,43)	0,64 (0,35—0,85)
	Ac/Exp		15,04 (12,45—17,38)*	8,04 (5,42—11,02)*
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	12,43 (10,29—14,36)**	6,60 (4,02—8,61)**
		8	10,37 (8,59—11,98)**	5,29 (3,06—6,77)**
		16	9,77 (8,08—11,28)**	4,73 (2,61—5,37)**
		32	5,19 (4,29—5,99)**	4,68 (3,14—4,97)**
	64	3,39 (2,80—3,91)**	3,60 (2,53—4,47)**	
CD4 ⁺ CD28 ⁺	Без активации		48,53 (46,40—49,32)	33,31 (29,65—37,65)
	Ac/Exp		41,98 (41,3—42,10)*	31,24 (26,65—36,65)
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	41,74 (39,23—43,23)	30,01 (24,87—33,60)
		8	42,25 (39,98—44,38)	28,88 (23,98—31,87)
		16	38,20 (37,22—38,42)**	25,59 (22,90—29,80)
		32	31,20 (30,29—31,62)**	21,52 (18,00—24,70)**
	64	26,14 (25,43—26,40)**	13,39 (12,30—14,98)**	
CD4 ⁺ CD45RO ⁻	Без активации		2,50 (2,07—3,09)	5,59 (4,46—6,82)
	Ac/Exp		6,48 (5,96—7,15)*	8,70 (8,37—8,75)*
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	6,92 (6,46—7,32)	9,87 (9,56—10,04)**
		8	7,15 (6,63—7,75)	11,54 (11,18—12,25)**
		16	7,95 (7,44—8,50)**	14,15 (13,62—14,98)**
		32	9,13 (8,91—9,55)**	16,26 (15,54—16,93)**
	64	10,75 (9,60—12,31)**	19,25 (17,57—20,73)**	

Примечание. Данные представлены в виде медианы, в скобках первый и третий квартили. * $p < 0,05$ — в сравнении с T-клетками, культивированными без активирующими частиц; ** $p < 0,05$ — в сравнении с T-клетками, культивированными с активирующими частицами без Dex

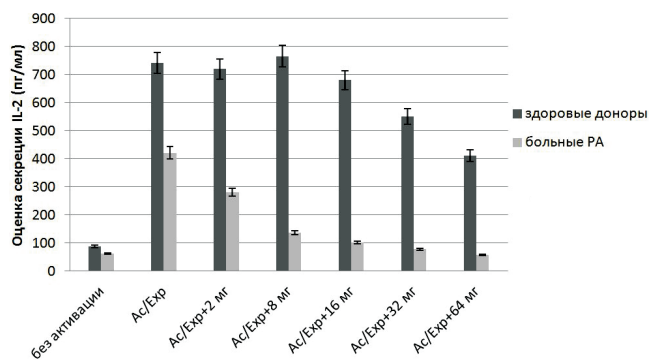


Рис. 1. Изменение секреции IL-2 (пг/мл) в культурах CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ лимфоцитов, полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, на фоне TCR-стимуляции, в условиях инкубации с разными концентрациями дексаметазона (Dex).

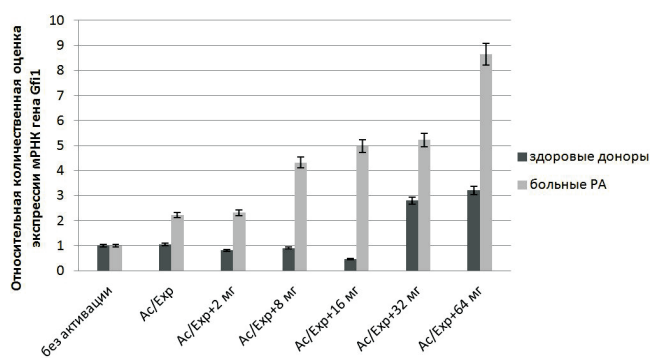


Рис. 2. Уровень относительной экспрессии мРНК гена *Gfi1* в культурах CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ лимфоцитов, полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, на фоне TCR-стимуляции, в условиях инкубации с разными концентрациями дексаметазона (Dex).

рах здоровых доноров и больных РА, тогда как уровень транскрипции мРНК генов *Gfi1* и *U2af114*, напротив, возрастал с увеличением действующей концентрации Dex (рис. 2—4). Изменения носили однонаправленный характер, но имели разную степень выраженности.

Общепринято, что процессы клеточного гомеостаза Т-лимфоцитов оценивают по изменению экспрессии поверхностных молекул активации, костимуляции, пролиферации и апоптоза, а также продукции медиаторов, отражающих каскад реакций, направленных на изменение функционального статуса лимфоцитов в результате активации Т-клеточного рецептора (TCR) [15]. TCR/CD28-стимуляция опосредует вступление покоящихся Т-клеток в G1-фазу клеточного цикла, для которой характерна активация системы IL-2-IL-2Ra за счет связывания транскрипционных факторов (NFAT, NF-KB и AP-1) в CD28-регулирующем элементе и смежном NF-IL-2B AP-1-сайте в промоторе гена IL-2 [16—18], тогда как появление рецептора к трансферрину (CD71/TfR1) на мембране Т-лимфоцита обеспечивает транспорт в активированную клетку ионов железа и свидетельствует об индукции процесса пролиферации, менее зависимого от аутокринного воздействия IL-2 [19, 20].

В связи с вышесказанным, реакция CD3⁺CD45RO⁺ культур клеток (обеих групп) на активатор была вполне закономерной [16, 21, 22] и сопровождалась увеличением числа CD4⁺ Т-лимфоцитов, экспрессирующих поверхностные молекулы активации (CD25) и пролиферации (CD71), снижением содержания CD4⁺CD28⁺ Т-клеток, а также ростом продукции Т-клетками IL-2 (таблица). В свою очередь, индуцированное TCR-активатором снижение уровня относительной экспрессии мРНК

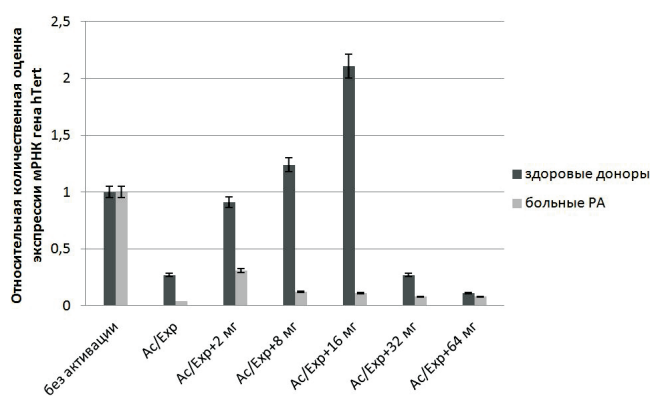


Рис. 3. Уровень относительной экспрессии мРНК гена *hTert* в культурах CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ лимфоцитов, полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, на фоне TCR-стимуляции, в условиях инкубации с разными концентрациями дексаметазона (Dex).

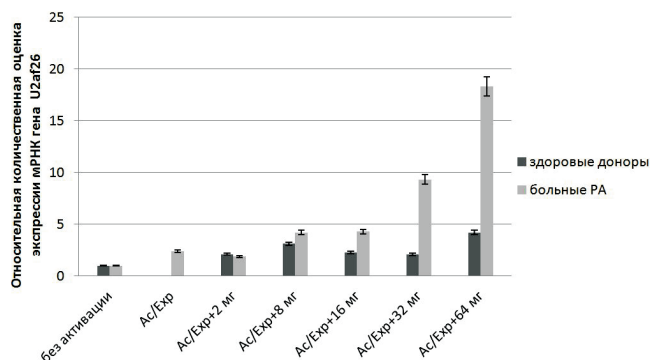


Рис. 4. Уровень относительной экспрессии мРНК гена *U2af26* в культурах CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ лимфоцитов, полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, на фоне TCR-стимуляции, в условиях инкубации с разными концентрациями дексаметазона (Dex).

гена каталитической субъединицы теломеразы (*hTERT*) в Т-клетках подтверждает роль стойкой/хронической стимуляции в подавлении активности фермента теломеразы [23], способствуя, тем самым укорочению длины теломер и завершая репликативный потенциал антиген-специфических Т-клеток [24]. Более выраженное снижение изучаемого показателя в пробах больных РА (в 23,5 раза по сравнению с интактными), обусловлено, вероятно, «поломкой» в теломерном механизме, приводящем к изменению функции Т-клеток и преждевременной эрозии теломер при РА [25].

В свою очередь, выявленное нами уменьшение содержания $CD3^+CD4^+CD28^+$ лимфоцитов может свидетельствовать об участии TCR-активации в созревании и дифференцировке $CD4^+CD45RO^+$ клеток в эффекторы, в том числе терминально-дифференцированные, реэкспрессирующие высокомолекулярную изоформу рецептора CD45 — CD45RA (T_{EMRA}). Последние отличаются низкой теломеразной активностью, способностью продуцировать провоспалительные молекулы (в частности, $TNF\alpha$), высокой экспрессией поверхностного маркера CD57, а также ростом содержания перфорина и гранзима А внутри клетки [26]. Как уже упоминалось ранее, различные изоформы молекулы CD45, генерируемые в результате альтернативного сплайсинга, обуславливают активность Т-клеток во время иммунного ответа [27, 28]. В свою очередь, соотношение вариантов общелейкоцитарного рецептора CD45 определяется антагонистическими взаимодействиями факторов: сплайсинга *U2AF26* (*U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1-like 4*, *U2af1l4*) и транскрипции *Gfi1* (*growth factor independent*) [1]. Предполагая, что активация может оказывать влияние на процессы созревания и дифференцировки $CD4^+CD45RO^+$ Т-клеток, мы оценили взаимосвязь между изменением уровней экспрессии мРНК генов *U2af1l4* и *Gfi1* и фенотипическими маркерами созревания Т-клеток, индуцированных ТCR-активатором.

Согласно полученным результатам, культивирование $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеток в присутствии активатора, сопровождалось повышением уровня экспрессии гена *Gfi1* (способствует формированию высокомолекулярной изоформы — CD45RA) в Т-лимфоцитах в обеих исследуемых группах, по сравнению с интактными проблемами (рис. 1). Интересно, что активатор значимо угнетал экспрессию мРНК гена *U2af1l4* (способствует образованию низкомолекулярных изоформ рецептора CD45RO) в Т-клетках здоровых доноров (в 35,43 раза); напротив, в культурах, полученных у больных РА, данный показатель возрос (в 2,2 раза) по отношению к пробам без активатора (рис. 2). Инкубация с активатором, как и

ожидалось, приводила к повышению числа $CD4^+CD45RO^+CD28^-$ Т-лимфоцитах в $CD3^+CD45RO^+$ культурах здоровых доноров и больных РА (таблица). Корреляционный анализ позволил выявить позитивные ассоциации между числом $CD4^+CD45RO^+CD28^-$ Т-клеток и уровнем экспрессии мРНК гена *Gfi1* в TCR-активированных пробах обеих групп ($r = 0,347$ и $r = 0,560$, $p < 0,05$ у здоровых доноров и больных РА соответственно), негативные между содержанием $CD4^+CD28^+$ Т-клеток и экспрессией гена *Gfi1* в Т-клетках только в пробах больных РА ($r = -0,874$, $p < 0,05$). Интересно, что нами также были обнаружены отрицательные ассоциации между уровнем экспрессии мРНК гена *hTERT* и *Gfi1* в Т-клетках, в пробах контроля и больных РА, а также экспрессией гена *hTERT* и числом $CD4^+CD45RO^+CD28^-$ Т-клеток у больных РА. Выявленные нами изменения исследуемых показателей, а также обнаруженные взаимосвязи могут свидетельствовать о генерации терминально-дифференцированных эффекторов ($CD3^+CD4^+CD28^-CD45RO$), реэкспрессирующих молекулу CD45RA на фоне стимуляции Т-клеточного рецептора в норме и при РА, в системе *in vitro* (таблица, рис. 2, рис. 3).

Не менее интересные результаты нами были получены при культивировании TCR-активированных $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеток с синтетическим ГК — дексаметазоном. Обладая мощным противовоспалительным потенциалом, ГК оказывают комплексное воздействие на клетки иммунной системы: блокируют высвобождение молекул воспаления, оказывают влияние на пролиферативную, миграторную и функциональную активность Т-лимфоцитов модулируют их апоптотическую гибель [29, 30].

Сочетанное действие Т-клеточного активатора и Дек сопровождалось дозозависимым снижением числа лимфоцитов, экспрессирующих молекулу костимуляции CD28 ($r^2 = -0,901$, $p < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r^2 = -0,910$, $p < 0,05$ — в культурах больных РА), маркеры активации CD25 ($r^2 = -0,887$, $p < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r^2 = -0,852$, $p < 0,05$ — в культурах больных РА) и пролиферации CD71 ($r^2 = -0,945$, $p < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r^2 = -0,959$, $p < 0,05$ — в культурах больных РА), а также продукции IL-2 в обеих исследуемых группах ($r^2 = -0,835$, $p < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r^2 = -0,946$, $p < 0,05$ — в культурах больных РА), что согласуется с данными литературы, и в целом, характеризует супрессивное действие ГК на клетки иммунной системы [31]. Так, ГК ингибируют транскрипцию и снижают стабильность мРНК гена IL-2 [32], а также препятствуют образованию димерных

комплексов (NFAT+AP-1) и предотвращают их взаимодействие с промоторными областями гена IL-2 [33]. Очевидно, что снижение продукции IL-2 способствует супрессии IL-2-зависимых процессов активации Т-лимфоцитов, что подтверждено обнаруженными нами положительными ассоциациями между содержанием IL-2 и числом CD4⁺CD28⁺ клеток в CD3⁺CD45RO⁺ культурах ($r = 0,794$, $\rho < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r = 0,921$, $\rho < 0,05$ — в культурах больных РА) и содержанием CD4⁺CD25⁺ лимфоцитов ($r = 0,901$, $\rho < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r = 0,900$, $\rho < 0,05$ — в культурах больных РА), а также уровнем IL-2 и числом CD4⁺CD71⁺ клеток ($r = 0,894$, $\rho < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r = 0,900$, $\rho < 0,05$ — в культурах больных РА) во всем спектре действующих концентраций Dex в сочетании с анти-CD2/CD3/CD28-частицами.

Как уже упоминалось ранее, Т-клетки в процессе репликативного старения, ассоциированного с непрерывной TCR-стимуляцией (вирусной или антигенной) или в условиях длительного провоспалительного цитокинового микроокружения, постепенно утрачивают экспрессию молекулы коактивации CD28 [34—36]. Логично, что снижение числа Т-клеток, экспрессирующих CD28, приводит к ингибированию последовательных процессов активации и пролиферации. Вышесказанное подтверждают выявленные нами ассоциации между содержанием CD4⁺CD28⁻ и CD4⁺CD25⁺ Т-клеток в CD3⁺CD45RO⁺ культурах ($r = -0,794$, $\rho < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r = -0,804$, $\rho < 0,05$ — в культурах больных РА); CD4⁺CD28⁻ и CD4⁺CD71⁺ ($r = -0,731$, $\rho < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r = -0,704$, $\rho < 0,05$ — в культурах больных РА); CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD71⁺ ($r = 0,892$, $\rho < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r = 0,471$, $\rho < 0,05$ — в культурах больных РА) при действии Dex (во всем диапазоне концентраций) на фоне TCR-стимуляции. Согласно данным научной периодики, снижение числа CD3⁺CD28⁺, индуцированное хронической активацией, отражает процессы образования популяции аутореактивных CD3⁺CD4⁺CD28⁻ лимфоцитов, способных к немедленной реализации эффекторных функций [34], которые отличаются высоким провоспалительным потенциалом и короткими теломерами [26].

Добавление Dex в культуры TCR-активированных Т-клеток способствовало повышению уровня относительной экспрессии мРНК гена *Gfi1*, продукт которого отвечает за формирование высокомолекулярных изоформ рецептора — CD45RA, в пробах здоровых доноров ($r^2 = 0,563$, $\rho < 0,05$) и больных РА ($r^2 = 0,873$, $\rho < 0,05$). Выявленные изменения

в обеих группах носили дозозависимый характер. Обнаруженное нами повышение числа CD3⁺CD4⁺CD45RO⁻ лимфоцитов в TCR-активированных культурах здоровых доноров ($r^2 = 0,954$, $\rho < 0,05$) и больных РА ($r^2 = 0,975$, $\rho < 0,05$), ассоциированное с уровнем экспрессии мРНК гена *Gfi1* в Т-клетках ($r = 0,892$ и $r = 0,892$, $\rho < 0,05$ соответственно) при действии Dex подтверждает предположение о роли продукта гена *Gfi1* в процессах альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*, кодирующего общелейкоцитарный рецептор — CD45.

Интересно, что Dex также способствовал относительно равномерному повышению уровня экспрессии гена *U2af114* (оказывающему противоположное *Gfi1* действие на альтернативный сплайсинг гена *Ptprc*) в Т-клетках здоровых доноров и дозозависимому росту исследуемого показателя в пробах больных РА ($r^2 = 0,680$, $\rho < 0,05$). Мы предполагаем, что высокая экспрессия гена *U2af114* в CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетках, способствует сохранению / поддержанию экспрессии низкомолекулярной формы рецептора — CD45RO Т-лимфоцитами при действии ГК, на фоне стимуляции Т-клеточного рецептора.

Вместе с тем, обнаруженное нами снижение транскрипции мРНК гена *hTERT* ($r^2 = -0,976$, $\rho < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r^2 = -0,976$, $\rho < 0,05$ — в культурах больных РА) наряду с уменьшением содержания CD4⁺CD28⁺ лимфоцитов, в ответ на сочетанное действие Т-клеточного активатора и Dex, а также выявленные корреляционные взаимосвязи между CD4⁺CD28⁻CD45RO⁻ и CD4⁺CD28⁺ ($r = -0,728$; $\rho < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r = -0,690$; $\rho < 0,05$ — в культурах больных РА), CD4⁺CD28⁻CD45RO⁻ и *hTERT* ($r = -0,891$; $\rho < 0,05$ — в культурах больных РА), CD4⁺CD28⁺ и *hTERT* ($r = 0,94$; $\rho < 0,05$ — в культурах больных РА) также подтверждают участие ГК, в частности Dex, в созревании CD4⁺CD45RO⁺ клеток в T_{EMRA} эффекторы в норме и при РА.

Заключение

В целом, анализируя данные литературы и полученные нами результаты, следует резюмировать, что постоянная аутоантигенная стимуляция Т-лимфоцитов при РА способствует значительному снижению экспрессии гена *hTERT* и как следствие, эрозии теломер [10], накоплению терминально-дифференцированных CD4⁺CD28⁻CD45RA⁺ Т-клеток [24], приобретающих устойчивость к апоптозу и конкурирующих с вновь образованными лимфоцитами [37]. Проведенное нами исследование убедительно доказывает, что в системе *in vitro* ГК (Dex), на фоне TCR-акти-

вазии, способствуют созреванию и дифференцировке Т-клеток в популяцию аутореактивных терминальных эффекторов (Т_{ЕМРА}), которые характеризуются потерей костимулирующей молекулы CD28, реэкспрессией высокомолекулярной изоформы молекулы CD45 — CD45RA, а также низкой теломеразной активностью. Мы предполагаем, что популяция CD3⁺CD4⁺CD45RO⁻CD28⁻ Т-клеток является ключевым участником в патогенезе РА, ускоренно приобретающая свой негативный потенциал на фоне ГК терапии, способствуя прогрессии заболевания, в частности, за счет мощного выброса провоспалительных факторов.

Список литературы

1. Luterek-Puszynska K., Malinowski D., Paradowska-Gorycka A., Safranow K., Pawlik A. CD28, CTLA-4 and CCL5 gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2017; 36(5): 1129-1135.
2. Mateen S., Zafar A., Moin S., Khan A.Q., Zubair S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta*. 2016; 455: 161-171.
3. VanderBorghet A., Geusens P., Raus J., Stinissen P. The autoimmune pathogenesis of rheumatoid arthritis: role of autoreactive T cells and new immunotherapies. *Semin Arthritis Rheum*. 2001; 31(3): 160-175.
4. Spreafico R., Rossetti M., Whitaker J.W., Wang W., Lovell D.J., Albani S. Epipolymorphisms associated with the clinical outcome of autoimmune arthritis affect CD4⁺ T cell activation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113(48): 13845-13850.
5. Thewissen M., Linsen L., Somers V., Geusens P., Raus J., Stinissen P. Premature immunosenescence in rheumatoid arthritis and multiple sclerosis patients. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1051: 255-262.
6. Тодосенко Н.М., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А., Малинина И.П., Литвинова Л.С. Влияние метилпреднизолона на процессы активации CD4⁺CD45RO⁺ Т-клеток при ревматоидном артрите (in vitro). *Цитология*. 2017; 59 (6): 421-427.
7. Heyd F., ten Dam G., Moroy T. Auxiliary splice factor U2AF26 and transcription factor Gfi1 cooperate directly in regulating CD45 alternative splicing. *Nat. Immunol*. 2006; 7 (8): 859-867.
8. Butte M.J., Lee S.J., Jesneck J., Keir M.E., Haining W.N., Sharpe A.H. CD28 costimulation regulates genome-wide effects on alternative splicing. *PLoS ONE*. 2012; 7 (6): e40032.
9. Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Сохоневич Н.А., Гончаров А.Г., Литвинова Л.С. Альтернативный сплайсинг молекулы CD45 в механизмах молекулярно-генетического контроля дифференцировки Т-клеток. *Российский иммунологический журнал*. 2015; 9 (1): 186-193.
10. Baschant U., Tuckermann J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2010; 120 (2-3): 69-75.
11. Gutsol A.A., Sokhnevich N.A., Yurova K.A., Khaziahmatova O.G., Shupletsova V.V., Litvinova L.S. Dose-dependent effects of dexamethasone on functional activity of T-lymphocytes with different grades of differentiation. *Molecular Biology*. 2015; 49 (1): 130-137.
12. Jeong H., Baek S.Y., Kim S.W., Eun Y.H., Kim I.Y., Kim H. et al. Comorbidities of rheumatoid arthritis: Results from the Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *PLoS One*. 2017; 12 (4): e0176260.
13. Anderson A.E., Swan D.J., Wong O.Y., Buck M., Eltherington O., Harry R.A. et al. Tolerogenic dendritic cells generated with dexamethasone and vitamin D3 regulate rheumatoid arthritis CD4⁺ T cells partly via transforming growth factor-β1. *Clin Exp Immunol*. 2017; 187 (1): 113-123.
14. Сытыбалдиев А.М. Лечение ревматической полимиалгии. *Современная ревматология*. 2013; 1: 66-72.
15. Motamedi M., Xu L., Elahi S. Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers. *J Immunol Methods*. 2016; 437: 43-52.
16. Kim H.P., Imbert J., Leonard W.J. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006; 17 (5): 349-366.
17. Miller J., Baker C., Cook K., Graf B., Sanchez-Lockhart M., Sharp K. et al. Two pathways of costimulation through CD28. *Immunol Res*. 2009; 45 (2-3): 159-172.
18. Beyersdorf N., Kerkau T., Hunig T. CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. *Immunotargets Ther*. 2015; 4: 111-122.
19. Marsee D.K., Pinkus G.S., Yu H. CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol*. 2010; 134 (3): 429-435.
20. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплетцова В.В. и др. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов. *Медицинская иммунология*. 2014; 16 (1): 7-26.
21. Stauber D.J., Debler E.W., Horton P.A., Smith K.A., Wilson I.A. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103 (8): 2788-2793.
22. Goudy K., Aydin D., Barzaghi F., Gambineri E., Vignoli M., Ciullini Mannurita S. et al. Human IL2RA null mutation mediates immunodeficiency with lymphoproliferation and autoimmunity. *Clin Immunol*. 2013; 146 (3): 248-261.
23. Horikawa I., Barrett J.C. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis*. 2003; 24 (7): 1167-1176.
24. Weyand C.M., Fujii H., Shao L., Goronzy J.J. Rejuvenating the immune system in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2009; 5 (10): 583-588.
25. Koetz K., Bryl E., Spickschen K., O'Fallon W.M., Goronzy J.J., Weyand C.M. T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97 (16): 9203-9208.
26. Matsuki F., Saegusa J., Miyamoto Y., Misaki K., Kumagai S., Morinobu A. CD45RA-Foxp3(high) activated/effector regulatory T cells in the CCR7 + CD45RA-CD27 + CD28+ central memory subset are decreased in peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 438 (4): 778-783.
27. Ярилин А.А. *Иммунология*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010.

28. Yurova K.A., Sokhonevich N.A., Khaziakhmatova O.G., Litvinova L.S. Cytokine-mediated of expression of Gfi1 and U2afll4 genes by activated T-cells with various differentiation status in vitro. *Biochemistry (Moscow) Supplement series B: Biomedical Chemistry*. 2015; 9 (2): 165-172.

29. Makrygiannakis D., Revu S., Neregard P., af Klint E., Snir O., Grundtman C. et al. Monocytes are essential for inhibition of synovial T-cell glucocorticoid-mediated apoptosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008; 10 (6): R147.

30. Davis T.E., Kis-Toth K., Szanto A., Tsokos G.C. Glucocorticoids suppress T cell function by up-regulating microRNA-98. *Arthritis Rheum*. 2013; 65 (7): 1882-1890.

31. Baschant U., Tuckermann J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010; 120 (2-3): 69-75.

32. Liberman A.C., Refojo D., Druker J., Toscano M., Rein T., Holsboer F. et al. The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction. *Faseb J*. 2007; 21 (4): 1177-1188.

33. Elshabrawy H.A., Chen Z., Volin M.V., Ravella S., Virupannavar S., Shahrara S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis*. 2015; 18 (4): 433-448.

34. Pieper J., Johansson S., Snir O., Linton L., Rieck M., Buckner J.H. et al. Peripheral and site-specific CD4 + CD28 null T cells from rheumatoid arthritis patients show distinct characteristics. *Scand J Immunol*. 2014; 79 (2): 149-155.

35. van Leeuwen E.M., Remmerswaal E.B., Vossen M.T., Rowshani A.T., Wertheim-van Dillen P.M., van Lier R.A., ten Berge I.J. Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *Journal of immunology*. 2004, 173(3), 1834-1841.

36. Vallejo A.N., Schirmer M., Weyand C.M., Goronzy J.J. Clonality and longevity of CD4+CD28null T cells are associated with defects in apoptotic pathways. *Journal of immunology*. 2000; 165 (11): 6301-6307.

37. Fujii H., Shao L., Colmegna I., Goronzy J.J., Weyand C.M. Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106 (11): 4360-4365.

References

1. Luterek-Puszynska K., Malinowski D., Paradowska-Gorycka A., Safranow K., Pawlik A. CD28, CTLA-4 and CCL5 gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2017; 36(5): 1129-35.

2. Mateen S., Zafar A., Moin S., Khan A.Q., Zubair S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta*. 2016; 455: 161-71.

3. VanderBorghet A., Geusens P., Raus J., Stinissen P. The autoimmune pathogenesis of rheumatoid arthritis: role of autoreactive T cells and new immunotherapies. *Semin Arthritis Rheum*. 2001; 31(3): 160-75.

4. Spreafico R., Rossetti M., Whitaker J.W., Wang W., Lovell D.J., Albani S. Epipolymorphisms associated with the clinical outcome of autoimmune arthritis affect CD4+ T cell activation pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113(48): 13845-50.

5. Thewissen M., Linsen L., Somers V., Geusens P., Raus J., Stinissen P. Premature immunosenescence in rheumatoid arthritis and multiple sclerosis patients. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1051: 255-62.

6. Todosenko N.M., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Malinina I.P., Litvinova L.S. Effects of methylprednisolone on process of activation and proliferation of memory CD4 + T cells of patients with rheumatoid arthritis (in vitro). *Tsitologiya*. 2017; 59 (6): 421-7. (in Russian)

7. Heyd F., ten Dam G., Moroy T. Auxiliary splice factor U2AF26 and transcription factor Gfi1 cooperate directly in regulating CD45 alternative splicing. *Nat. Immunol*. 2006; 7 (8): 859-67.

8. Butte M.J., Lee S.J., Jesneck J., Keir M.E., Haining W.N., Sharpe A.H. CD28 costimulation regulates genome-wide effects on alternative splicing. *PLoS ONE*. 2012; 7 (6): e40032.

9. Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Sokhonevich N.A., Goncharov A.G., Litvinova L.S. Alternative splicing CD45 in the process of differentiation of T memory cells. *Russiykiy Immunologicheskij zhurnal*. 2015; 9 (4): 186-93. (in Russian)

10. Baschant U., Tuckermann J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2010; 120 (2-3): 69-75.

11. Gutsol A.A., Sokhonevich N.A., Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Litvinova L.S. Dose-dependent effects of dexamethasone on functional activity of T-lymphocytes with different grades of differentiation. *Molecular Biology*. 2015; 49 (1): 130-7.

12. Jeong H., Baek S.Y., Kim S.W., Eun Y.H., Kim I.Y., Kim H. et al. Comorbidities of rheumatoid arthritis: Results from the Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *PLoS One*. 2017; 12 (4): e0176260.

13. Anderson A.E., Swan D.J., Wong O.Y., Buck M., Eltherington O., Harry R.A. et al. Tolerogenic dendritic cells generated with dexamethasone and vitamin D3 regulate rheumatoid arthritis CD4⁺T cells partly via transforming growth factor-β1. *Clin Exp Immunol*. 2017; 187 (1): 113-23.

14. Satybaldyev A.M. Treatment for rheumatic polymyalgia. *Sovremennaya revmatologiya*. 2013; 1: 66-72. (in Russian)

15. Motamedi M., Xu L., Elahi S. Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers. *J Immunol Methods*. 2016; 437: 43-52.

16. Kim H.P., Imbert J., Leonard W.J. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006; 17 (5): 349-66.

17. Miller J., Baker C., Cook K., Graf B., Sanchez-Lockhart M., Sharp K. et al. Two pathways of costimulation through CD28. *Immunol Res*. 2009; 45 (2-3): 159-72.

18. Beyersdorf N., Kerkau T., Hunig T. CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. *Immunotargets Ther*. 2015; 4: 111-22.

19. Marsee D.K., Pinkus G.S., Yu H. CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol*. 2010; 134 (3): 429-35.

20. Litvinova L.S., Gutsol A.A., Sokhonevich N.A., Kofanova K.A., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V. et al. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. *Med Immun*. 2014; 16 (1): 7-26. (in Russian)

21. Stauber D.J., Debler E.W., Horton P.A., Smith K.A., Wilson I.A. Crystal structure of the IL-2 signaling complex:

paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103 (8): 2788-93.

22. Goudy K., Aydin D., Barzaghi F., Gambineri E., Vignoli M., Ciullini Mannurita S. et al. Human IL2RA null mutation mediates immunodeficiency with lymphoproliferation and autoimmunity. *Clin Immunol*. 2013; 146 (3): 248-61.

23. Horikawa I., Barrett J.C. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis*. 2003; 24 (7): 1167-76.

24. Weyand C.M., Fujii H., Shao L., Goronzy J.J. Rejuvenating the immune system in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2009; 5 (10): 583-8.

25. Koetz K., Bryl E., Spickschen K., O'Fallon W.M., Goronzy J.J., Weyand C.M. T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97 (16): 9203-8.

26. Matsuki F., Saegusa J., Miyamoto Y., Misaki K., Kumagai S., Morinobu A. CD45RA-Foxp3(high) activated/effector regulatory T cells in the CCR7 + CD45RA-CD27 + CD28+central memory subset are decreased in peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 438 (4): 778-83.

27. Yarilin A.A. *Immunology. [Immunologiya]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. (in Russian)

28. Yurova K.A., Sokhonevich N.A., Khaziakhmatova O.G., Litvinova L.S. Cytokine-mediated of expression of Gfi1 and U2af14 genes by activated T-cells with various differentiation status in vitro. *Biochemistry (Moscow) Supplement series B: Biomedical Chemistry*. 2015; 9 (2): 165-72.

29. Makrygiannakis D., Revu S., Neregard P., af Klint E., Snir O., Grundtman C. et al. Monocytes are essential for inhibition of synovial T-cell glucocorticoid-mediated

apoptosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008; 10 (6): R147.

30. Davis T.E., Kis-Toth K., Szanto A., Tsokos G.C. Glucocorticoids suppress T cell function by up-regulating microRNA-98. *Arthritis Rheum*. 2013; 65 (7): 1882-90.

31. Baschant U., Tuckermann J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010; 120 (2-3): 69-75.

32. Liberman A.C., Refojo D., Druker J., Toscano M., Rein T., Holsboer F. et al. The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction. *Faseb J*. 2007; 21 (4): 1177-88.

33. Elshabrawy H.A., Chen Z., Volin M.V., Ravella S., Virupannavar S., Shahrara S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis*. 2015; 18 (4): 433-48.

34. Pieper J., Johansson S., Snir O., Linton L., Rieck M., Buckner J.H. et al. Peripheral and site-specific CD4 + CD28 null T cells from rheumatoid arthritis patients show distinct characteristics. *Scand J Immunol*. 2014; 79 (2): 149-55.

35. van Leeuwen E.M., Remmerswaal E.B., Vossen M.T., Rowshani A.T., Wertheim-van Dillen P.M., van Lier R.A., ten Berge I.J. Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *Journal of immunology*. 2004, 173(3), 1834-41.

36. Vallejo A.N., Schirmer M., Weyand C.M., Goronzy J.J. Clonality and longevity of CD4+CD28null T cells are associated with defects in apoptotic pathways. *Journal of immunology*. 2000; 165 (11): 6301-7.

37. Fujii H., Shao L., Colmegna I., Goronzy J.J., Weyand C.M. Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106 (11): 4360-5.

Сведения об авторах:

Тодосенко Наталья Михайловна, мл. науч. сотр., ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта», e-mail: tod_89@mail.ru;

Юрова Кристина Алексеевна, канд. мед. наук, науч. сотр. ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта», e-mail: kristina_kofanova@mail.ru;

Хазиахматова Ольга Геннадьевна, канд. биол. наук, науч. сотр. ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта», e-mail: hazik36@mail.ru;

Малинина Ирина Петровна, Заслуженный врач РФ, врач высшей категории, главный внештатный ревматолог МЗ Калининградской области, зав. отделением ревматологии ГБУЗ «Областная клиническая больница Калининградской области», e-mail: malinina@list.ru;

Литвинова Лариса Сергеевна, доктор мед. наук, зав. лаб., ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта», e-mail: larisalitinova@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092

Кашутин С.Л.¹, Шерстенникова А.К.¹, Николаев В.И.², Ключарева С.Н.², Пирятинская В.А.²

Изучение содержания нейтрофилов, несущих молекулы адгезии, у больных псориазом

¹ ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет», 163000, Россия, г. Архангельск, пр. Троицкий, д. 51

² ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», 195067, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Кирочная, д. 41

Изучение механизмов регуляции миграционной активности нейтрофильных лейкоцитов в кожу при псориазе, представляет собой не только теоретический, но и практический интерес, поскольку с высокой интенсивностью инфильтрации нейтрофилами в эпидермисе, связано более тяжелое течение заболевания. Как известно, процесс миграции нейтрофилов через эндотелий микроциркуляции регулируется молекулами адгезии. **Цель исследования** состояла в определении содержания нейтрофилов, экспрессирующих молекулы адгезии, в зависимости от сегментации их ядра. **Методика.** В венозной крови определяли удельный вес молекул адгезии на нейтрофилах и сегментацию их ядер. Исследование проведено у 82 больных с вульгарным и экссудативным псориазом в прогрессирующую и стационарную стадии (из них 39 женщин и 43 мужчины) в возрасте от 20 до 60 лет. Группу контроля составили 50 практически здоровых лиц (из них 28 женщин и 22 мужчины). **Результаты** исследования показали, что в прогрессирующую и стационарную стадии псориаза наблюдалось снижение количества нейтрофилов, несущих молекулы адгезии, исключение составило увеличение числа нейтрофилов с молекулами L-селектина. Анализ сегментограммы у больных псориазом выявил более высокий удельный вес нейтрофилов с двумя и тремя сегментами в ядре, при этом концентрация нейтрофилов с четырьмя и пятью сегментами была статистически достоверно ниже. **Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о повышенной миграционной активности нейтрофилов из крови в ткань в прогрессирующую и стационарную стадии псориаза.

Ключевые слова: нейтрофилы; молекулы адгезии; сегментация ядер нейтрофилов.

Для цитирования: Кашутин С.Л., Шерстенникова А.К., Николаев В.И., Ключарева С.Н., Пирятинская В.А. изучение содержания нейтрофилов, несущих молекулы адгезии, у больных псориазом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 98—103. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8529

Для корреспонденции: Шерстенникова Александра Константиновна, канд. мед наук, доцент каф. нормальной физиологии ГБОУ ВО СГМУ, e-mail: a.sherstennikova@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.11.2016

Kashutin S.L.¹, Sherstennikova A.K.¹, Nikolaev V.I.², Klyuchareva S.N.², Piryatinsky V.A.²

Content of neutrophils carrying adhesion molecules in patients with psoriasis

¹ Northern State Medical University, Troitsky Pr. 51, Arkhangelsk 163000, Russia

² I.I. Mechnikov North-West State Medical University, Kirochnaya Str. 41, St. Petersburg 195067, Russia

Studying regulation of neutrophil migration to the skin in psoriasis is of both theoretical and practical interest since high-intensity epidermal infiltration by neutrophils is associated with more severe disease. The process of neutrophil transmigration through the microvascular endothelium is known to be regulated by adhesion molecules. The **aim** of the study was to measure the content of neutrophils expressing adhesion molecules based on neutrophil nucleus segmentation. **Methods.** Specific gravity of adhesion molecules expressed on neutrophils and segmentation of neutrophil nuclei were determined in venous blood. The study included 82 patients (39 women and 43 men aged 20-60) with vulgar and exudative psoriasis at progressive and stationary stages. The control group consisted of 50 healthy individuals (28 women and 22 men). **Results.** Progressive and stationary stages of psoriasis were associated with a decreased number of neutrophils carrying adhesion molecules, except for the increased number of neutrophils with L-selectin molecules. Analysis of neutrophil segmentation in patients with psoriasis showed a higher specific gravity of neutrophils with 2 and 3 nuclear lobes («segments»); the content of neutrophils with 4 and 5 nuclear lobes was significantly lower. **Conclusion.** The results indicate increased activity of neutrophil migration from blood into tissue at progressive and stationary stages of psoriasis.

Keywords: neutrophils, adhesion molecules, nuclear segmentation of neutrophil.

For citation: Kashutin S.L., Sherstennikova A.K., Nikolaev V.I., Klyuchareva S.N., Piryatinsky V.A. Content of neutrophils carrying adhesion molecules in patients with psoriasis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(4): 98–103. (in Russian). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8529

For correspondence: Sherstennikova A.K. (assistant professor, of department normal physiology NSMU), e-mail a.sherstennikova@yandex.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Kashutin S.L. <http://orcid.org/0000-0002-2687-3059>

Sherstennikova A.K. <http://orcid.org/0000-0001-8576-6459>

Nikolaev V.I. <http://orcid.org/0000-0001-7494-6497>

Klyuchareva S.N. <http://orcid.org/0000-0003-0801-6181>

Piryatinsky V.A. <http://orcid.org/0000-0002-3166-522X>

Received 27.11.2016

Введение

Накопленный в настоящее время фактический материал показывает, что функциональные возможности нейтрофильных лейкоцитов выходят за пределы традиционного представления как о клетках исключительно системы противoinфекционной защиты [1, 2]. Имеется достаточно много свидетельств о роли нейтрофилов в представлении антигенов и аутоантигенов моноцитам и лимфоцитам, их влияния на антителообразование, а также возможности участия в регулировании функции иммунокомпетентных клеток через продукцию цитокинов [3–5].

Инфильтрация нейтрофилами эпидермиса при псориазе, при котором гиперпролиферация кератиноцитов опосредована активированными Т-лимфоцитами, служит еще одним свидетельством многогранности функций нейтрофилов [6–8]. В данном случае уникальность псориаза как модели для изучения миграции нейтрофилов заключается в инфильтрации нейтрофилами эпидермиса при отсутствии инфекционного фактора в зоне пораженной кожи [9, 10]. Кроме того, механизмы регуляции миграционной активности нейтрофильных лейкоцитов в кожу при псориазе представляют теоретический и практический интерес, поскольку с высокой интенсивностью инфильтрации нейтрофилами эпидермиса связано более тяжелое течение заболевания [6, 8].

Известно, что компартмент нейтрофилов крови включает в себя циркулирующий и маргинальный пулы, а миграция нейтрофилов через эндотелий микроциркуляции регулируется молекулами адгезии [11]. Процесс миграции нейтрофилов в ткани представляет собой трехступенчатый процесс, включающий скольжение — «роллинг» — нейтрофильных лейкоцитов по поверхности эндотелия с последующей фазой прочной адгезии и заканчивающийся фазой трансми-

рации через эндотелий [12, 13]. Роллинг нейтрофилов опосредуется низкоаффинными рецепторами — селектинами, в том числе L-селектинами [14]. Фаза прочной адгезии реализуется с участием молекул LFA-1, LFA-3, ICAM-1 [15]. Собственно, миграция лейкоцитов через эндотелий связана с экспрессией молекул PECAM [16].

Фактически нет сведений о зависимости уровня экспрессии молекул адгезии циркулирующего пула нейтрофилов от морфологических изменений этих клеток, в частности, выраженности сегментации их ядра. Известно, что с увеличением сегментации ядра нейтрофилов увеличивается способность их к миграции в ткани [16].

Цель исследования — определение содержания нейтрофилов, экспрессирующих молекулы адгезии, в зависимости от сегментации их ядра в условиях антигенной нагрузки, связанной с гиперпролиферацией кератиноцитов (на модели псориаза).

Методика

Проведено клинико-иммунологическое обследование 82 больных с вульгарным и экссудативным псориазом в прогрессирующую и стационарную стадии (из них 39 женщин и 43 мужчин) в возрасте от 20 до 60 лет. Давность заболевания составила от 3 мес. до 10 лет. В качестве контрольной группы обследовано 50 практически здоровых лиц (из них 28 женщин и 22 мужчин). На проточном цитометре FC-500 фирмы Beckman Coulter (США) определяли удельный вес L-селектина (CD62L, FITC), LFA-1 (CD11a, FITC), LFA-3 (CD58, FITC), ICAM-1 (CD54, FITC), PECAM-1 (CD31, FITC) на нейтрофилах цельной крови.

В мазке крови, зафиксированном смесью Никифорова и окрашенном по Романовскому-Гимзе, опре-

деляли удельный вес нейтрофилов среди других лейкоцитов: эозинофилов, базофилов, моноцитов, лимфоцитов. Цитоскопическое исследование нейтрофильных лейкоцитов проводили путем подсчета среднего количества фрагментов ядра у 100 клеток [17].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерного пакета прикладных программ SPSS 13.0 for Windows. Распределение параметров не было нормальным, в связи с чем описание выборок проводили с помощью подсчета медианы (Me) и межквартильного интервала C25C75. Вероятность различий оценивали по непараметрическому критерию Колмогорова—Смирнова и Вилкоксона. Корреляционный анализ проведен с использованием коэффициента корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Общее содержание нейтрофильных лейкоцитов у больных псориазом не отличалось от уровня контрольной группы и составило $3,51 \times 10^9$ кл/л (2,89,4,58) против $3,90 \times 10^9$ кл/л (3,02,4,78);

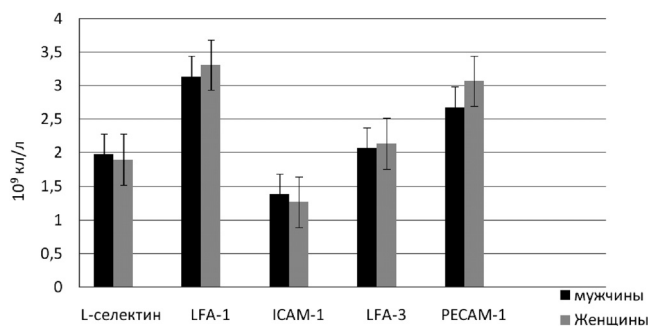


Рис. 1. Содержание нейтрофилов, экспрессирующих молекулы адгезии, в зависимости от пола у больных псориазом (10^9 кл/л). По оси абсцисс — нейтрофилы с молекулами адгезии: L-селектин (CD62L), LFA-1 (CD11a), ICAM-1 (CD54), LFA-3 (CD58), PECAM-1 (CD31) у мужчин и женщин. По оси ординат — удельный вес нейтрофилов, содержащих молекулы адгезии в 10^9 кл/л (Me).

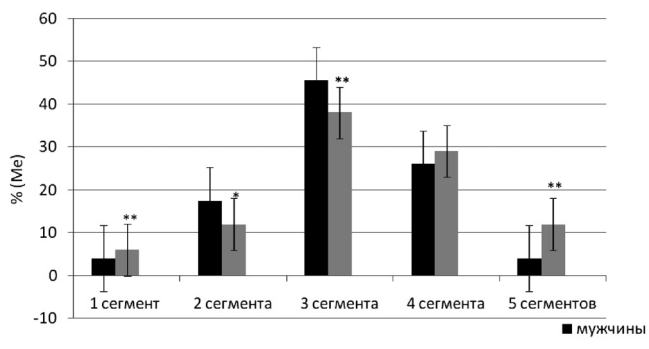


Рис. 2. Сегментограмма нейтрофилов в зависимости от пола у больных псориазом. По оси абсцисс — сегментация ядер нейтрофилов у мужчин и женщин. По оси ординат — содержание нейтрофилов в % (Me). $p < 0,05$; $p^{**} < 0,01$ сравнение между мужчинами и женщинами (непараметрический критерий Колмогорова—Смирнова).

$Z = 0,79$; $\rho = 0,55$. Абсолютное количество нейтрофилов с молекулой L-селектина при псориазе обнаруживало тенденцию к снижению (с $2,43 \times 10^9$ кл/л (1,34;3,63) до $2,20 \times 10^9$ кл/л (1,39;2,99); $Z = 0,87$; $\rho = 0,42$). Подобная тенденция была зарегистрирована также в отношении концентрации нейтрофилов, несущих молекулу LFA-1 (с $3,67 \times 10^9$ кл/л (2,85;4,60) до $3,25 \times 10^9$ кл/л (2,24;4,36); $Z = 0,99$; $\rho = 0,27$) и ICAM-1 ($1,91 \times 10^9$ кл/л (1,16;2,85) до $1,58 \times 10^9$ кл/л (0,71;2,62); $Z = 0,94$; $\rho = 0,33$). Отличия в концентрации нейтрофилов с молекулой LFA-3 и PECAM-1 у больных псориазом были подтверждены статистически: $2,32 \times 10^9$ кл/л (1,43;3,65) против $3,14 \times 10^9$ кл/л (1,77;4,55); $Z = 1,46$; $\rho = 0,02$ и $3,0 \times 10^9$ кл/л (2,20;3,76) против $3,53 \times 10^9$ кл/л (2,59;4,47); $Z = 0,95$; $\rho = 0,31$.

Таким образом, при псориазе имеется тенденция к снижению уровня экспрессии молекул адгезии на нейтрофилах, участвующих на этапах «роллинга», «прочной адгезии» и «трансмиграции».

Изучение уровня экспрессии молекул адгезии нейтрофилами у больных псориазом в зависимости от пола выявило отсутствие статистически значимых различий. Однако у женщин больных псориазом содержание нейтрофилов с молекулами LFA-1, LFA-3 и PECAM-1 было несколько выше (рис. 1).

Анализ сегментограммы показал, что в венозной крови у больных псориазом индекс сегментации статистически значимо ниже ($3,17$ (2,96;3,43); против $3,38$ (3,21;3,52); $Z = 2,16$; $\rho = 0,001$) за счет более высокого удельного веса нейтрофилов с двумя сегментами ($14,0\%$ (10,0;23,0) против $12,0\%$ (9,0;16,0); $Z = 1,4$; $\rho = 0,03$) и тремя сегментами ($41,0\%$ (34,0;48,0) против $38,0\%$ (31,0;41,0); $Z = 1,44$; $\rho = 0,03$) в ядре. При этом концентрация нейтрофилов с четырьмя и пятью сегментами была статистически значимо ниже: $27,0\%$ (22,0;34,0) против $31,0\%$ (28,0;35,0); $Z = 1,63$; $\rho = 0,01$) и $7,0\%$ (3,0;14,0) против $13,0\%$ (10,5;18,5) $Z = 2,44$; $\rho = 0,001$ соответственно.

При изучении структуры сегментограммы у больных псориазом в зависимости от пола выявлено наличие статистически значимых различий. Так, в сравнении с мужчинами у женщин больных псориазом существенно снижался удельный вес нейтрофилов с двумя сегментами (с $17,5\%$ (11,0;24,0) до $12,0\%$ (8,0;16,5) $Z = 1,45$; $\rho = 0,02$) и тремя сегментами (с $45,5\%$ (41,0;50,25) до $38,0\%$ (29,5;44,5); $Z = 1,97$; $\rho = 0,001$) на фоне увеличения числа нейтрофилов с одним и пятью сегментами (с $4,0\%$ (3,0;5,0) до $6,0\%$ (5,0;8,5); $Z = 2,52$; $\rho = 0,001$) (с $4,0\%$ (1,0;8,0) до $12,0\%$ (5,0;22,0); $Z = 1,88$; $\rho = 0,002$) соответственно (рис. 2).

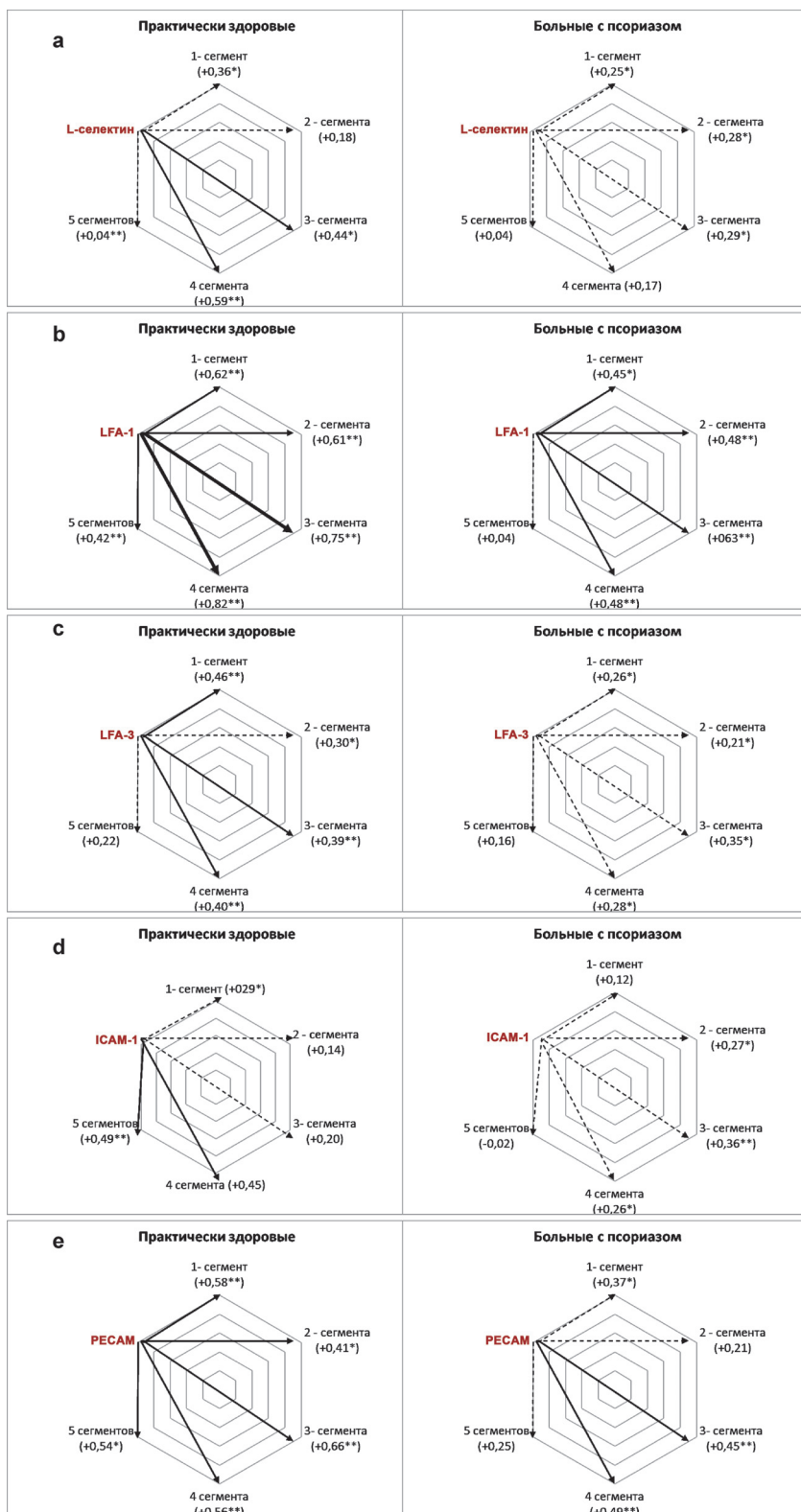


Рис. 3. Корреляционные связи между показателями удельного веса молекул: а) адгезии L-селектина (CD62L), б) LFA-1 (CD11a), в) LFA-3 (CD58), д) ICAM-1 (CD54), е) PECAM-1 (CD31) на нейтрофилах и сегментацией ядер нейтрофильных лейкоцитов. Условные обозначения: слабая связь – стрелка со штрихами; умеренная связь – стрелка средней толщины; высокая связь – стрелка толстая. В скобках указаны корреляционные значения по Спирмену и значимость коэффициента корреляции * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$.

Корреляционный анализ на этапе «роллинга» у больных псориазом показал наличие слабых, однако значимых корреляций между уровнем экспрессии L-селектина и удельным весом нейтрофилов с одним-тремя сегментами в ядре. Напротив, между концентрацией нейтрофилов с L-селектином и содержанием четырех-пяти сегментарных нейтрофилов, значимых корреляций не выявлено, что является отличием от контроля, где выявляется связь между содержанием нейтрофилов с L-селектином и нейтрофилами с четырьмя сегментами в ядре (рис. 3, а).

На этапе «прочной адгезии» количество нейтрофилов с молекулой LFA-1 коррелировало с концентрацией нейтрофилов с одним-пятью сегментами в ядре как у больных псориазом, так и у здоровых лиц, с той разницей, что у больных псориазом наблюдалось ослабление корреляционных связей (рис. 3, б). Между содержанием нейтрофилов с рецепторами LFA-3 выявлены корреляции с концентрациями нейтрофилов, содержащими 1—4 сегмента в ядре как у больных псориазом, так и у здоровых лиц. Корреляций с числом нейтрофилов, содержащих 5 сегментов в ядре не прослеживалось ни у больных псориазом, ни в группе контроля (рис. 3, с). Существенные различия были отмечены в отношении нейтрофилов, экспрессирующих молекулу ICAM-1: у больных псориазом в отличие от контроля регистрировались статистически значимые корреляции с содержанием нейтрофилов с двумя-четырьмя сегментами в ядре, которые отсутствовали в случае, когда ядра нейтрофилов имели 5 и более сегментов (рис. 3, d). На этапе «трансмиграции» у практически здоровых регистрировались статистически значимые корреляции между содержанием нейтрофилов, имеющих рецепторы PECAM-1 с концентрацией нейтрофилов, содержащих 1—5 и более сегментов в ядре. У больных псориазом корреляционные связи ослабевали и даже отсутствовали в случае с нейтрофилами, содержащими 2 и 5 сегментов в ядре (рис. 3, e).

Итак, в прогрессирующую и стационарную стадии псориаза циркулирующие нейтрофильные лейкоциты имеют на своей поверхности молекулы адгезии — L-селектина, LFA-1, ICAM-1, LFA-3, PECAM-1. Если учитывать, что в сосудистом русле существуют 2 почти равных пула нейтрофилов: циркулирующий и пристеночный, и при заборе венозной крови сосчитывается только циркулирующий пул, можно полагать, что у больных псориазом, впрочем, как и в группе контроля, уже на уровне нейтрофилов циркулирующего пула имеются все необходимые возможности для трансмиграции [1, 15, 18]. При этом обращает на себя внимание факт снижения абсолютного количества нейтрофилов, несущих данные молекулы адгезии.

Снижение абсолютного количества нейтрофилов, экспрессирующих молекулы адгезии, может быть связано либо с уменьшением поступления их из красного костного мозга в кровь, либо повышением интенсивности миграции из крови в ткань, в частности, в кожу. В случае снижения поступления нейтрофилов из красного костного мозга изменения в структуре сегментограммы касались бы резкого увеличения незрелых форм, т.е. односегментных нейтрофилов [5]. В соответствии с полученными данными, при псориазе, напротив, регистрировали увеличение двух- и трехсегментных форм, что, не подтверждает версию о снижении поступления нейтрофилов из красного костного мозга в периферическую кровь.

В пользу повышенной миграционной активности нейтрофилов из крови в ткань может свидетельствовать наличие положительных статистически значимых корреляций между концентрациями двух- и трехсегментных форм нейтрофилов с содержанием нейтрофилов с молекулами L-селектина, LFA-1, ICAM-1, LFA-3, PECAM-1. Кроме того, в пользу повышенной миграционной активности нейтрофилов из крови в кожу также свидетельствуют скопления нейтрофилов в эпидермисе псориазической папулы, определяемые как псевдоабсцессы Мунро [6].

В свою очередь известно, что адгезия, вызванная селектинами обратима, кратковременна и малоэффективна. Более прочную и необратимую адгезию нейтрофилов к эндотелию обуславливают $\beta 2$ -интегрины, к которым относится молекула LFA-1 [12]. В соответствии с результатами исследования при псориазе число нейтрофилов циркулирующего пула с молекулой LFA-1 превышало число нейтрофилов с молекулой L-селектина ($3,25 \times 10^9$ кл/л (2,24;4,36) против $2,20 \times 10^9$ кл/л (1,39;2,99); $W = -6,58$; $\rho = 0,0001$). Учитывая возможность протеолитического отщепления молекулы L-селектина при экспрессии на нейтрофилах $\beta 2$ -интегринов на клеточной поверхности, что определяется как шеддинг-феномен, можно предполагать, что шеддинг молекул L-селектина при псориазе проявляется среди нейтрофилов циркулирующего пула достаточно активно и связан с необходимостью более интенсивной миграции нейтрофилов в ткань [9, 10]. С учетом различий, в уровне экспрессии L-селектина и LFA-1 на нейтрофилах у мужчин и женщин, можно полагать, что шеддинг молекул L-селектина более активен у женщин больных псориазом.

Таким образом, при псориазе наблюдается более усиленная миграция нейтрофилов из периферической крови, о чем свидетельствует снижение абсолютного числа нейтрофилов с молекулами L-селектина, LFA-1, LFA-3, ICAM-1 и PECAM-1 на фоне увеличения удельного веса нейтрофилов с двумя и тремя сегментами в ядре при уменьшении содержания четырех- и пятисегментных форм.

Список литературы

1. Долгушин И.И., Бухарин О.В. *Нейтрофилы и гомеостаз*. Екатеринбург; 2001. 278 с.
2. Пинегин Б.В. Нейтрофилы: структура и функция. *Иммунология*. 2007; 28 (6): 374-84.
3. Абакумова Т.В., Антонева И.И., Генинг Т.П., Генинг С.О., Долгова Д.Р., Фомина А.В. Цитокиновый профиль и метаболическая активность нейтрофилов периферической крови при прогрессировании неоплазмы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 4: 86-90.
4. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. *Клетки иммунной системы*. СПб.: Наука; 2001. 390с.
5. Цинкернагель Р. *Основы иммунологии*. М: Мир; 2008. 134 с.
6. Цветкова Г.М., Мордовцева В.В., Вавилов А.М., Мордовцев В.Н. *Патоморфология болезней кожи: руководство для врачей*. М.: Медицина; 2003. 496 с.
7. Sigmundsdottir H., Gudjonsson J.E., Jonsdottir I., Valdimarsson H. The frequency of CLA CD8+ T cells in the blood of psoriasis patients correlates closely with the severity of their disease. *J. Clin. and Exp. Immunol.* 2001; 126 (2): 365-9.
8. Ghoreschi K., Rocken M. Immunopathogenese der Psoriasis. *JDDG*. 2003; 1(7): 524-32.
9. Schon M., Behmenburg C., Denzer D., Scon M.P., Schon M. Pathogenic function of IL-1 in psoriasiform skin lesions of flaky skin (fsn/fsn) mice. *J. Clin. and Exp. Immunol.* 2001; 123(3): 505-510.
10. Gudjonsson J.E., Jonhanson A., Sigmundsdottir H. Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *J. Clin. and Exp. Immunol.* 2004; 135(1): 1-8.
11. Пальцев М.А. *Межклеточные взаимодействия*. М.: Медицина; 1995. 224 с.
12. Smith C.J. Adhesion molecules and receptors. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008; 121: 375.
13. Rot A. Neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) induces in vitro neutrophil migration by haptotactic mechanism. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23: 303-6.
14. Smith C.A., Gruss H.-J., Davis T. et al. CD30 antigen, a marker for Hodgkin lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *J. Cell.* 1993; 73: 1349-60.
15. Кошевенко Ю.Н. Механизмы клеточного иммунитета в коже. *Косметика и медицина*. 2001; 3: 15-26.
16. Rot A. Some aspects of IL-8 pathophysiology. III Chemokine interaction with endothelial cells. *J. Leukocyte Biol.* 1996; 59: 3944.
17. Тодоров Й.Т. *Клинические лабораторные исследования в педиатрии*. София; 1968. 1064 с.
18. Ярилин А.А. Кожа и иммунная система. *Косметика и медицина*. 2001; 2: 5-13.

Сведения об авторах:

Кашутин Сергей Леонидович, доктор мед. наук, доцент, зав. каф. кожных и венерических болезней Северного государственного медицинского университета, e-mail: sergeycash@yandex.ru

Николаев Валентин Иванович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова

Ключарева Светлана Викторовна, доктор мед., проф., каф. дерматовенерологии Северо-западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова

Пирятинская Вера Андреевна, канд. мед. наук, доцент каф. дерматовенерологии Северо-западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова

References

1. Dolgushin I.I., Buharin O.V. *Neutrophils and homeostasis. [Neytrofily i gomeostaz]*. Ekaterinburg; 2001. (in Russian)
2. Pinegin B.V. Neutrophils: structure and function. *Immunologiya*. 2007; 28 (6): 374-84. (in Russian)
3. Abakumova T.V., Antoneeva I.I., Gening T.P., Gening S.O., Dolgova D.R., Fomina A.V. Cytokine profile and metabolic activity of peripheral blood neutrophils in the progression of neoplasms. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2014; 4: 86-90. (in Russian)
4. Frejdlin I.S., Totoljan A.A. *Cells of the immune system. [Kletki immunnoy sistemy]*. SPb.; Nauka; 2001. (in Russian)
5. Cinkernagel' R. *Essentials of Immunology. [Osnovy immunologii]*. Moscow; Mir; 2008. (in Russian)
6. Cvetkova G.M., Mordovceva V.V., Vavilov A.M., Mordovcev V.N. *Pathology of skin diseases: a guide for physicians. [Patomorfologiya bolezney kozhi: rukovodstvo dlya vrachey]*. Moscow; Meditsina; 2003. (in Russian)
7. Sigmundsdottir H., Gudjonsson J.E., Jonsdottir I., Valdimarsson H. The frequency of CLA CD8+ T cells in the blood of psoriasis patients correlates closely with the severity of their disease. *J. Clin. and Exp. Immunol.* 2001; 126 (2): 365-9.
8. Ghoreschi K., Rocken M. Immunopathogenese der Psoriasis. *JDDG*. 2003; 1(7): 524-32.
9. Schon M., Behmenburg C., Denzer D., Scon M.P., Schon M. Pathogenic function of IL-1 in psoriasiform skin lesions of flaky skin (fsn/fsn) mice. *J. Clin. and Exp. Immunol.* 2001; 123(3): 505-10.
10. Gudjonsson J.E., Jonhanson A., Sigmundsdottir H. Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *J. Clin. and Exp. Immunol.* 2004; 135(1): 1-8.
11. Pal'cev M. A. *Cellular interactions. [Mezhkлетochnye vzaimodejstviya]*. Moscow: Meditsina; 1995. (in Russian)
12. Smith C.J. Adhesion molecules and receptors. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008; 121: 375.
13. Rot A. Neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) induces in vitro neutrophil migration by haptotactic mechanism. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23: 303-6.
14. Smith C.A., Gruss H.-J., Davis T. et al. CD30 antigen, a marker for Hodgkin lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *J. Cell.* 1993; 73: 1349-60.
15. Koshevenko Ju.N. The mechanisms of cellular immunity in the skin. *Kosmetika i meditsina*. 2001; 3: 15-26. (in Russian)
16. Rot A. Some aspects of IL-8 pathophysiology. III Chemokine interaction with endothelial cells. *J. Leukocyte Biol.* 1996; 59: 3944.
17. Todorov J.T. *Clinical laboratory studies in pediatric patients. [Klinicheskie laboratornye issledovaniya v pediatrii]*. Sofiya; 1968. (in Russian)
18. Jarilin A.A. The skin and the immune system. *Kosmetika i meditsina*. 2001; 2: 5-13. (in Russian)

© Коллектив авторов, 2017
УДК 591.473.3:577.175.5:612.444

Труш В.В.¹, Соболев В.И.²

Модулирующее влияние адреналина на развитие стероидной миопатии у белых крыс, индуцированной длительным введением гидрокортизона

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, г. Ялта, Россия, ул. Стахановская, д. 11

Цель исследования — изучение эффективности адреналина в компенсации негативных эффектов длительно вводимого гидрокортизона на скелетную мышцу смешанного типа. **Методика.** Эксперименты проводились на половозрелых крысах-самках (190—220 г), разделенных на 3 группы: контрольную ($n = 10$), I опытную ($n = 10$, ежедневно на протяжении 30 сут. получали гидрокортизона ацетат, Г-группа) и II опытную ($n = 10$, ежедневно на протяжении 30 сут. получали гидрокортизона ацетат в комплексе с адреналина гидрохлоридом, (Г+А)-группа). Гидрокортизона ацетат («Фармак», Украина) вводили внутривенно в дозе, адекватной терапевтической для человека, — 3 мг/кг. Адреналина гидрохлорид («Здоровье», Украина) вводили подкожно в дозе 0,2 мг/кг. На наркотизированных животных (тиопентал натрия, 100 мг/кг) с помощью методов электромиографии и миографии изучали параметры функционального состояния передней большеберцовой мышцы в условиях ее сокращения, индуцированного раздражением сверхпороговым электрическим током малоберцового нерва. **Результаты.** Длительное (в течение 30 сут.) введение гидрокортизона вызывало развитие симптомов стероидной миопатии, о чем свидетельствует появление низкоамплитудных М-ответов нормальной длительности, возрастание частоты полифазных потенциалов (до 30%), уменьшение количества активируемых двигательных единиц (на 33%) и мышечной массы (на 14%). Гидрокортизоновый гиперкортицизм сопровождался удлинением латентного периода одиночного сокращения передней большеберцовой мышцы (на 37%) и фазы его укорочения (на 20%), уменьшением амплитуды одиночных сокращений (на 32%), объема выполненной мышцей внешней работы (на 40%) и развиваемой мощности (на 41%) при тетаническом сокращении. Отмечены нарушения в целостном процессе нервно-мышечной передачи, что проявлялось в уменьшении степени ее надежности (у 30% особей), выраженном облегчении (более 85% у 50% особей) или депрессии (до -42% у 40% особей) при стимуляции нервно-мышечного аппарата с оптимальной частотой (30 имп/с). Адреналин, вводимый в комплексе с гидрокортизоном, предотвращал появление ряда симптомов миопатии, таких, как снижение амплитуды М-ответов, уменьшение количества активируемых двигательных единиц мышцы, ее массы, внешней работы и мощности, а также обуславливал уменьшение частоты генерации полифазных М-ответов (с 30% до 10%). Кроме того, адреналин ослаблял негативный эффект гидрокортизона на синаптический аппарат, что проявлялось в уменьшении частоты встречаемости сниженной надежности синаптической передачи (с 30% до 10%), выраженного ее облегчения (с 50% до 20%) и депрессии (с 40% до 10%) у животных (Г+А)-группы в сравнении с Г-группой. **Заключение.** Полученные в модельных экспериментах на животных в условиях *in situ* данные свидетельствуют о способности адреналина эффективно компенсировать ряд негативных эффектов, развивающихся в скелетной мышце при длительном введении гидрокортизона.

Ключевые слова: скелетная мышца; гидрокортизон; гиперкортицизм; стероидная миопатия; адреналин.

Для цитирования: Труш В.В., Соболев В.И. Модулирующее влияние адреналина на развитие стероидной миопатии у белых крыс, индуцированной длительным введением гидрокортизона. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 104—111. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8530

Для корреспонденции: Труш Вера Владимировна, канд. мед. наук, проф., зав. каф. физиологии человека и животных ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет», e-mail: ver.trush@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.01.2017

Trush V.V.¹, Sobolev V.I.²

The modulatory effect of adrenaline on development of steroid myopathy induced by chronic administration of hydrocortisone in white rats

¹ Department of Human and Animal Physiology, Donetsk National University, Shchorsa Str. 46, Donetsk 83050, Ukraine

² Department of Health and Rehabilitation, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Stakhanovskaya Str. 11, the Republic of Crimea, Yalta 298635, Russia

Based on the beneficial effect of chronic adrenergic stimulation on the neuromuscular apparatus function, the **aim** of this study was to evaluate efficacy of adrenaline at therapeutic doses in compensation for adverse effects of chronically administered hydrocortisone on mixed-fiber type skeletal muscles (*m. tibialis anterior*). **Method.** Experiments were performed on sexually mature female rats (190—220 g) divided into 3 groups: control (n = 10), experimental group 1 (H group, n = 10, hydrocortisone acetate, for 30 days daily), and experimental group 2 (H+A group, n = 10, hydrocortisone acetate in combination with adrenaline hydrochloride, for 30 days daily). Hydrocortisone acetate (Farmak, Ukraine) was injected i.p. at a dose of 0.2 mg/kg, which was equivalent to the human therapeutic dose of 3 mg/kg. Adrenaline hydrochloride (Zdorovje, Ukraine) was injected s.c. at a dose of 0.2 mg/kg. Parameters of the tibialis anterior muscle function were studied on anesthetized animals (sodium thiopental, 100 mg/kg) using electromyography and myography methods. Muscle contractions were induced by suprathreshold electrical stimulation of the fibular nerve. **Results.** Chronic administration (30 days) of hydrocortisone caused symptoms of steroid myopathy evident as low-amplitude M-waves of normal duration, increased frequency of polyphase potentials (by 30%), decreased quantity of activated motor units (by 33%), and decreased muscle mass (by 14%). Hydrocortisone-induced hypercorticoidism was associated with prolonged latent period (by 37%) and shortening phase (by 20%) and decreased amplitude (by 32%), amount of muscular external work (by 40%) in a single tibialis anterior muscle contraction, and decreased muscular power (by 41%) developed in a tetanic contraction. Following repeated hydrocortisone injections, the overall process of neuromuscular transmission was disturbed, which was evident as its impaired reliability (30% of rats) and pronounced facilitation (>85% in 50% of rats) or depression (<-42% in 40% of rats) at an optimum stimulation frequency (30 imp/s). Adrenaline administered in combination with hydrocortisone prevented formation of myopathy symptoms, such as decreases in the M-wave amplitude, number of activated motor units, muscle weight, external work and power, and it also decreased the frequency of polyphase M-waves (from 30% to 10%). In addition, adrenaline attenuated the adverse effect of hydrocortisone on the synaptic apparatus by decreasing the incidence of reduced reliability of synaptic transmission (from 30% to 10%), facilitation (from 50% to 20%), and depression (from 40% to 10%) in the H+A-group compared to the H group. **Conclusion.** The experimental data obtained in model experiments on animals *in situ* support the adrenaline ability to effectively compensate for a number of adverse effects of chronic hydrocortisone treatment on the skeletal muscle.

Keywords: skeletal muscle; hydrocortisone; hypercorticoidism; steroid myopathy; adrenaline.

For citation: Trush V.V., Sobolev V.I. The modulating influence of adrenaline on the development of the steroid myopathy induced by long application of hydrocortisone at white rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61 (4): 104—111. (in Russian).

DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8530

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

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

Acknowledgements. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Trush V.V., <http://orcid.org/0000-0001-8514-8431>

Sobolev V.I., <http://orcid.org/0000-0001-9318-5224>

Received 11.01.2017

Введение

Естественные глюкокортикоиды и их синтетические аналоги наряду с позитивными клиническими эффектами оказывают выраженное негативное влияние на нервно-мышечную, иммунную, костную и ряд других систем в связи с конечным катаболическим эффектом на их структуры [1, 2]. Проявления стероидной миопатии хорошо известны [3], однако вопросы, касающиеся способов ее компенсации, остаются открытыми.

В более ранних наших публикациях [4—6] приводятся доказательства способности близких к физиологическим доз тироксина, терапевтических доз тестостерона и нестероидного анаболика инозина ком-

пенсировать некоторые негативные эффекты длительно вводимого дексаметазона на скелетную мускулатуру. Вместе с тем, остается мало изученным вопрос относительно эффективности адренергической стимуляции мышцы в компенсации стероидной миопатии.

В настоящее время твердо установлены положительные эффекты катехоламинов на скелетную мускулатуру: доказано их активирующее влияние на энергообмен и энергообеспечение мышечных волокон, эффективность электромеханического сопряжения в них, состояние синаптической передачи [7—10]. При многократной стимуляции организма катехоламинами выявлена их способность модулировать энергетическую эффективность сократительного акта [11],

а через мембранные рецепторы и разнообразные внутриклеточные посредники (протеинкиназа А, С, кальмодулинзависимую протеинкиназу, MAP-киназы, CREB и другие) — активировать матричный синтез в различных клетках-мишенях [12], что должно позитивно отражаться на их функциональном состоянии. Все это наряду с другими данными указывает на способность катехоламинов оказывать влияние на фундаментальные механизмы мышечного сокращения, что позволяет рассматривать их с точки зрения возможных модуляторов функционального состояния нервно-мышечной системы в терапии эндокринной патологии.

В качестве рабочей гипотезы было принято предположение о возможности ослабления проявлений стероидной миопатии, вызванной многократными инъекциями гидрокортизона, в случае его совместно с адреналином введения.

Цель исследования — изучение эффективности адреналина в компенсации негативных эффектов длительно вводимого гидрокортизона на скелетную мышцу смешанного типа.

Методика

Все исследования были 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» [13]. Эксперименты проводились на половозрелых белых крысах-самках (190—220 г), разделенных на 3 группы. Животные 1-й группы ($n = 10$) ежедневно на протяжении 30 сут. получали гидрокортизон (*Г-группа*). Крысам 2-й группы ($n = 10$) ежедневно в течение 30 сут. вводили гидрокортизон в комплексе с адреналином (*(Г+А)-группа*). Контролем служила 3-я группа (*К-группа*, $n = 10$). Гидрокортизон (гидрокортизона ацетат, «Фармак», Украина) вводили внутривенно в дозе, адекватной терапевтической для человека, 3 мг/кг. Адреналин (адреналина гидрохлорид, «Здоровье», Украина) вводили подкожно в дозе 0,2 мг/кг.

После окончания подготовительного периода у наркотизированных (тиопентал натрия, внутривенно, 100 мг/кг) животных всех групп в условиях *in situ* с помощью методов электромиографии и миографии изучали ряд параметров функционального состояния передней большеберцовой мышцы (*m. tibialis anterior*). Среди многочисленных методов электромиографии был выбран метод регистрации М-ответов скелетной мышцы, генерируемых при электрической стимуляции малоберцового нерва. Для раздражения

нерва использовались биполярные игольчатые электроды с межэлектродным расстоянием 1 мм, а также электростимулятор, построенный на основе функционального генератора ICL8038CCDP и оптронной гальванической развязки. Суммарный электрический потенциал (М-ответ) отводился от средней части переднеберцовой мышцы биполярными игольчатыми электродами с межэлектродным расстоянием 1 мм, затем усиливался (измерительный усилитель на основе INA118) и регистрировался с помощью цифровых запоминающих осциллографов Siglent (SDS1062CM) или Tektronix (TDS2004C).

При исследовании эргометрических параметров сокращения передней большеберцовой мышцы использовали метод миографии. С этой целью стопу задней лапки животного фиксировали в станке, и на уровне большого пальца затягивали лигатуру, соединенную с потенциометрическим датчиком (ПТП-1). Для регистрации миограммы использовали многоканальный цифровой запоминающий осциллограф, что позволило с высокой разрешающей способностью измерять амплитудные и временные параметры мышечного сокращения с последующим вычислением эргометрических показателей (работа и мощность).

Алгоритм опыта

На 1-м этапе регистрировали серию одиночных М-ответов при раздражении малоберцового нерва сверхпороговыми электрическими импульсами длительностью 150 мкс каждый с частотой 0,2 имп/с и силой тока 500 мкА. Вычисляли латентный период генерации М-ответа (мс), его продолжительность (мс) и амплитуду (мВ); проводилась также оценка формы М-ответов на предмет их полифазности (в % от общего числа).

На 2-м этапе опыта регистрировали цикл из 40 М-ответов при прогрессивно нарастающей в течение 4 с силе раздражения. С этой целью электростимулятор переводился в режим генерации прямоугольных импульсов частотой 10 имп/с при линейно нарастающей амплитуде от подпороговых до сверхпороговых значений. На основании процентного изменения амплитуды максимального М-ответа относительного амплитуды минимального определяли приблизительное количество активируемых двигательных единиц мышцы (методика Galea V. [14]).

На 3-м этапе в течение 5 с регистрировали пачку М-ответов при раздражении нерва сверхпороговыми импульсами (сила тока 500 мкА) при низкой частоте (4 имп/с) и постоянной длительности импульсов (150 мкс). На основании полученных записей по изменению амплитуды 5-го М-ответа относительно 1-го, принятого за 100%, оценивали декремент затухания М-ответов [15].

На 4-м этапе опыта в течение 5 с записывали М-ответы мышцы при оптимальной для нервно-мышечного соединения частоте раздражения нерва — 30 имп/с [15], силе тока 500 мкА и длительности импульсов 150 мкс. На основании записи М-ответов определяли изменение их амплитуды относительно 1-го, амплитуда которого принималась за 100%. Считается [15, 16], что увеличение амплитуды М-ответов мышцы в более чем 30% относительно 1-го в серии при раздражении нервно-мышечного аппарата с оптимальной частотой (30 имп/с) свидетельствует о патологическом облегчении синаптической передачи, тогда как уменьшение амплитуды М-ответов более чем 25% относительно амплитуды 1-го указывает на патологически значимую депрессию нервно-мышечной передачи.

На 5-м этапе эксперимента в течение 5 с регистрировались одиночные сокращения мышцы с внешней нагрузкой 20 г при частоте раздражения нерва 4 имп/с, силе тока 500 мкА и длительности импульсов 150 мкс. На основании анализа миограммы определяли латентный период сокращения мышцы (мс), амплитуду (мм), а также длительность фазы укорочения и расслабления (мс).

На заключительном, 6-м, этапе опыта проводили регистрацию тетанического сокращения мышцы с внешней нагрузкой 70 г. Сокращение мышцы вызывали путем раздражения малоберцового нерва сверхпороговым электрическим током силой 1000 мкА при частоте 70 имп/с и длительности импульсов 0,5 мс в течение 6 с. На основании полученных миограмм рассчитывали объем выполненной мышцей внешней работы (мДж) и развиваемую при этом мощность (мВт).

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

Для оценки степени статистической значимости различий между контрольной и опытными группами использовали t-критерий Стьюдента, предварительно убедившись в том, что распределение значений в вариационном ряду соответствует нормальному закону (W-тест Шапиро—Уилка, Statistica 7.0). Значения $p < 0,05$ рассматривали как статистически значимые.

Результаты и обсуждение

Длительное введение гидрокортизона вызывало выраженное ухудшение функционального состояния передней большеберцовой мышцы, отражающее развитие стероидной миопатии, а комбинированные инъекции гидрокортизона с адреналином, напротив — приводили к нормализации ряда параметров сократительного акта.

Характеристика параметров М-ответа скелетной мышцы

Анализ результатов показал, что у животных, получавших гидрокортизон (Г-группа), наблюдалось значимое удлинение (на 20%) относительно контроля латентного периода М-ответа и уменьшение его амплитуды на 35% на фоне неизменной длительности, а также некоторое увеличение частоты встречаемости полифазных потенциалов (табл. 1).

Удлинение латентного периода М-ответа в условиях непрямой электрической стимуляции нервно-мышечного аппарата может быть вызвано как замедлением нервно-мышечного проведения, так и десинхронизацией возбуждения в мышце [15]. Уменьшение амплитуды М-ответов на фоне неизменной их длительности указывает не только на десинхронизацию возбуждения в мышце, но и дистрофические изменения мышечных волокон, сопровождающиеся уменьшением их толщины или выключением части патологически измененных волокон из общего возбуждения [15, 16]. Появление у 30% особей полифазных потенциалов уменьшенной амплитуды является еще одним доказательством в пользу развития миопатических изменений в исследуемой передней большеберцовой мышце.

С целью выявления возможных причин снижения амплитуды М-ответов у животных Г-группы нами было определено среднее количество активируемых при непрямом раздражении нервно-мышечного аппарата двигательных единиц [14]. Анализ полученных данных показал, что среднее количество активируемых двигательных единиц в Г-группе оказалось статистически значимо ниже (на 33%), контрольных значений (см. табл. 2). Кроме того, изолированное длительное введение гидрокортизона сопровождалось, хотя и слабым, но статистически значимым уменьшением массы мышцы (на 14% относительно контроля). Отмеченные изменения свидетельствуют о развитии дистрофических изменений в исследуемой мышце животных, получавших многократные инъекции гидрокортизона.

Применение адреналина в комплексе с гидрокортизоном в большинстве случаев сглаживало негативное действие глюкокортикоида на электрофизиологические параметры мышцы. В частности, введение гормональной пары «Г+А» предотвращало удлинение латентного периода и снижение амплитуды М-ответов (табл. 1), уменьшение количества активируемых двигательных единиц и массы мышцы (табл. 2), а также обуславливало снижение частоты появления полифазных М-ответов с 30% до 10% (табл. 1).

Функциональное состояние скелетной мышцы в большой степени может определяться процессами,

происходящими собственно в нервно-мышечном синапсе. Анализ результатов исследования показал, что у животных, получавших гидрокортизон (Г-группа), наблюдались негативные изменения со стороны нервно-мышечной передачи. В пользу этого свидетельствует наличие у 30% особей патологически значимого (превышающего 10% и достигающего 40% и более) декремента амплитуды 5-го М-ответа относительно 1-го при раздражении нервно-мышечного аппарата с частотой 4 имп/с. Вместе с тем, средний по Г-группе декремент амплитуды 5-го М-ответа относительно 1-го при стимуляции нервно-мышечного аппарата с частотой 4 имп/с не превышал 10%, хотя значимо отличался от такового контрольных животных. Наличие у 30% особей Г-группы патологически значимого

декремента амплитуды М-ответов при стимуляции нервно-мышечного аппарата с низкой частотой (3—5 имп/с) свидетельствует, согласно, о снижении степени надежности синаптической передачи [15].

Подтверждением предположения о развитии патофизиологических нарушений со стороны нервно-мышечного синапса после многократных инъекций гидрокортизона свидетельствуют результаты исследования амплитудной характеристики М-ответа не только при низкой (4 имп/с), но и оптимальной (30 имп/с) частоте стимуляции нерва. Так, у 50% особей Г-группы отмечалось патологически значимое (превышающее 30% и достигающее у некоторых особей 200% и более) облегчение синаптической передачи, а у 40% особей — патологически значимая

Таблица 1

Средние значения некоторых параметров М-ответа передней большеберцовой мышцы у крыс контрольной и опытных групп ($\bar{X} \pm m$)

Параметр М-ответа мышцы	Группа животных		
	К-группа (n = 10)	Г-группа (n = 10)	(Г+А)-группа (n = 10)
Параметры одиночного М-ответа			
Латентный период, мс	2,0 ± 0,04	2,4 ± 0,02 (+20%) *	1,9 ± 0,05
Амплитуда, мВ	2,6 ± 0,22	1,7 ± 0,17 (-35%) *	2,1 ± 0,18
Длительность, мс	5,5 ± 0,51	4,9 ± 0,44	5,0 ± 0,49
% полифазных потенциалов	0	30	10
Изменение (%) амплитуды 5-го М-ответа относительно 1-го при стимуляции нервно-мышечного аппарата с частотой 4 имп/с			
Декремент амплитуды 5-го М-ответа относительно 1-го, %	3,6 ± 1,23	-9,6 ± 5,50 *	-1,9 ± 3,42
Процентное количество особей в группе с декрементом амплитуды М-ответов более 10%	0	30	10
Изменение (%) амплитуды М-ответов относительно 1-го при стимуляции нервно-мышечного аппарата с частотой 30 имп/с			
Степень облегчения синаптической передачи (% относительно 1-го М-ответа)	11,1 ± 2,8	85,5 ± 27,9*	36,8 ± 20,2
Процентное количество особей в группе с облегчением синаптической передачи более 30%	0	50	20
Степень депрессии синаптической передачи (снижение амплитуды М-ответов в % относительно 1-го)	-2,9 ± 2,28	-17,7 ± 5,2 *	-10,5 ± 4,3
Процентное количество особей в группе с депрессией синаптической передачи более 25%	0	40	10
Примечание. * — значение показателя статистически значимо отличается (p<0,05) от уровня соответствующего параметра у крыс контрольной группы			

Таблица 2

Средние значения массы передней большеберцовой мышцы и количества активируемых двигательных единиц у животных контрольной и опытных групп ($\bar{X} \pm m$)

Группа животных	Масса мышцы, мг	Количество активируемых двигательных единиц
К-группа (контроль) (n = 10)	436 ± 13	13,6 ± 0,91
Г-группа (n = 10)	376 ± 13 (-14%) *	9,2 ± 0,89 (-32%) *
(Г+А)-группа (n = 10)	396 ± 14	11,8 ± 0,89
Примечание. * — различия статистически значимы (p<0,05) относительно уровня контрольных крыс (К-группа)		

(превышающая 25% и достигающая 38—42%) депрессия нервно-мышечной передачи. В целом, средняя по группе степень облегчения синаптической передачи существенно превосходила 30%, а депрессии не достигала и 25% (табл. 1).

Выраженное облегчение у 50% особей Г-группы синаптической передачи на фоне сниженного по амплитуде 1-го М-ответа при стимуляции нервно-мышечного аппарата с оптимальной частотой (30 имп/с) указывает на возможную исходную «заблокированность» синапсов [15]. Патологически значимая депрессия у 40% особей Г-группы амплитуды М-ответов свидетельствует о вероятных нарушениях в постсинаптическом звене, в частности, в результате десенситизации или уменьшения плотности холинорецепторов [16]. В пользу возможного негативного влияния длительно вводимых глюкокортикоидов на постсинаптическую мембрану мышечных волокон свидетельствуют и исследования других авторов, отмечавших блокирование ионных каналов холинорецепторов [17] или снижение их чувствительности к ацетилхолину [18] под влиянием высоких доз гидрокортизона.

Факт исходной «заблокированности» синапсов при гидрокортизоновом гиперкортицизме был установлен и в более ранних наших исследованиях при раздражении нервно-мышечного аппарата сверхпороговыми электрическими импульсами нарастающей частоты [19]. Некоторая «заблокированность» синапсов, согласно мнению специалистов [16], может быть вызвана дефицитом медиатора или нарушением его кальцийактивируемого высвобождения. Развитие «заблокированности» синапсов при гиперкортицизме вполне реально, — в исследованиях других специалистов показана способность высоких доз глюкокортикоидов уменьшать амплитуду токов концевой пластинки [20].

Периодическая депрессия синаптической передачи при ритмической генерации мышцей М-ответов с частотой 30 имп/с у 40% крыс Г-группы носила менее выраженный характер, чем ее облегчение. Данный факт свидетельствует в пользу того, что нарушения в постсинаптической мембране, связанные с уменьшением плотности или чувствительности холинорецепторов, при гиперкортицизме в нашей модели были меньше выражены, чем нарушения в пресинаптическом аппарате. Применение адреналина в комплексе с гидрокортизоном ослабляло выраженность нарушений в пресинаптическом аппарате, в пользу чего свидетельствует меньшая частота встречаемости случаев патологически значимого синаптического облегчения и меньшая его выраженность у животных (Г+А)-группы, по сравнению с изолированным применением глюкокортикоида (табл. 1).

Патологически значимая (составившая 38%) депрессия синаптической передачи при стимуляции нервно-мышечного аппарата с оптимальной частотой (30 имп/с) в (Г+А)-группе была отмечена только у 1 животного из 10. Таким образом, комплексное применение адреналина с гидрокортизоном уменьшило частоту встречаемости случаев депрессии синаптической передачи, вызванных постсинаптическими нарушениями.

Характеристика эргометрических параметров мышечного сокращения

Длительное изолированное введение гидрокортизона обуславливало ухудшение не только электрофизиологических, но и сократительных параметров исследуемой мышцы. Так, у животных Г-группы наблюдалось статистически значимое снижение относительно контроля амплитуды одиночного сокращения (на 32%), величины внешней работы мышцы в режиме гладкого тетануса (на 40%), а также мощности тетанического сокращения на 41% (табл. 3).

Таблица 3

Средние значения сократительных и энергетических параметров мышцы контрольных и опытных животных ($\bar{X} \pm m$)

Исследуемый параметр	Группа животных		
	К-группа (контроль)	Г-группа	(Г+А)-группа
Параметры одиночного сокращения (с внешней нагрузкой 20 г)			
Амплитуда укорочения, мм	2,9 ± 0,17	1,9 ± 0,18 (-32%) *	3,0 ± 0,29
Латентный период сокращения, мс	8,7 ± 0,35	11,9 ± 0,52 (+37%) *	9,2 ± 0,34
Продолжительность фазы укорочения, мс	30,1 ± 1,18	38,7 ± 1,54 (+29%) *	24,1 ± 1,12
Продолжительность фазы расслабления, мс	74,1 ± 4,17	88,0 ± 4,18 (+19%) *	77,5 ± 3,93
Параметры энергетики сокращения мышцы при выполнении 6-секундного гладкого тетануса с внешней нагрузкой 70 г			
Объем внешней работы, мДж	10,6 ± 0,84	6,3 ± 0,75 (-40%) *	8,6 ± 0,82
Развиваемая мощность при сокращении мышцы, мВт	11,3 ± 0,66	6,7 ± 0,72 (-41%) *	10,0 ± 0,74
Примечание. * — различия статистически значимы (p<0,05) относительно уровня контрольных крыс (К-группа)			

В основе наблюдаемого нами ухудшения сократительных параметров мышцы крыс Г-группы могут лежать, как минимум, две причины. Во-первых, уменьшение силы, развиваемой дистрофически измененными мышечными волокнами. Во-вторых, не исключено и полное выключение части патологически измененных волокон из сокращения, одним из доказательств которого является отмеченное нами ранее статистически значимое уменьшение (на 33% относительно контроля) количества активируемых двигательных единиц мышцы у животных Г-группы (табл. 2). Учитывая тот факт, что избыток глюкокортикоидов в организме вызывает очаговые изменения в скелетных мышцах [21], и, в первую очередь, страдают волокна гликолитического типа [22], можно предположить, что у животных Г-группы имело место выключение из сократительного акта именно части быстрых волокон, подвергшихся дистрофическим изменениям под действием гидрокортизона. В пользу такого предположения говорит удлинение параметров одиночного сокращения мышцы: латентного периода — на 37%, фазы укорочения — на 29% и расслабления — на 19%, а также уменьшение мощности тетанического сокращения (на 41%), относительно контроля (табл. 3). Ухудшение энергетических параметров мышцы было обнаружено и в более ранних наших исследованиях при длительном введении дексаметазона [23].

Введение адреналина в комплексе с гидрокортизоном нивелировало негативные эффекты глюкокортикоида на сократительные параметры мышцы. В частности, после 30 инъекций гормональной пары «Г+А» не наблюдалось типичного для изолированного применения гидрокортизона снижения амплитуды одиночных сокращений, увеличения их длительности, уменьшения внешней работы и мощности тетанического сокращения (табл. 3).

Подводя итог результатам наших исследований, необходимо отметить следующее. Длительное (в течение 1 мес.) ежедневное введение гидрокортизона в фармакологической дозе (3 мг/кг) сопровождалось развитием миопатических изменений в исследуемой передней большеберцовой мышце крыс, характеризующейся существенным преобладанием гликолитических волокон. При этом наряду с ухудшением электрофизиологических, сократительных и скоростных параметров сокращения мышцы наблюдались и определенные нарушения в синаптическом аппарате: уменьшение у части особей надежности синаптической передачи, выраженное ее облегчение или депрессия при стимуляции малоберцового нерва с оптимальной частотой.

Введение адреналина в комплексе с гидрокортизоном предотвращало ухудшение электрофизиологиче-

ских, сократительных и скоростных параметров сокращения мышцы, патологически значимых депрессий или облегчения синаптической передачи, типичных для мышцы животных, при изолированном введении глюкокортикоида.

Полученные в модельных экспериментах на животных в условиях *in situ* данные свидетельствуют о способности адреналина эффективно компенсировать ряд негативных эффектов, развивающихся в скелетной мышце при длительном введении гидрокортизона.

References

1. Shishkina L.N., Malkova E.M. Influence of a glucocorticoid kenalog on functional activity of macrophages and neutrophils both in lungs and in peritoneal cavity. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2011; 55 (1): 31-7. (in Russian)
2. Gardner D., Shoback D. *Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology*. 9th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2011.
3. Polunina A.G., Isaev F.V., Dem'ianova M.A. Steroid myopathy. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2012; 112 (10-2): 60-4. (in Russian)
4. 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. *Rossiyskiy Fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenov*. 2013; 99 (9): 1067-76. (in Russian)
5. Trush V.V. Influence of a Nonsteroid Anabolic Inosine on the Manifestation of the Effects of Dexamethasone on a Skeletal Muscle of White Rats. *Biologichni Studii.* 2012; 6 (2): 127-38. (in Ukrainian)
6. 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): 24-51.
7. Cairns S.P., Borrani F. β -Adrenergic modulation of skeletal muscle contraction: key role of excitation-contraction coupling. *J. Physiol.* 2015; 593(21): 4713-27.
8. Everts M.F., Retterstol K., Clausen T. Effects of adrenaline on excitation-induced stimulation of the sodium-potassium pump in rat skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1988; 134: 189-98.
9. Rizvi S.M., Azeem MA. Adrenaline improves endurance of rabbit gastrocnemius: a study with continuous high frequency stimulation. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2013; 26(4): 773-7.
10. Grip J., Jakobsson T., Hebert C., Klaude M., Sandstrom G., Wernerman J., Rooyackers O. Lactate kinetics and mitochondrial respiration in skeletal muscle of healthy humans under influence of adrenaline. *Clin Sci (Lond)*. 2015; 129(4): 375-84.
11. Sobolev V.I., Korotkova T.P. Influence of multiple injections of adrenaline on power of muscular contraction. *Arkhiv klinicheskoy i ehksperimental'noy meditsiny*. 2001; 10 (2): 216-17 (In Russian)
12. Rutter G.A., Rizzuto R. Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca^{2+} release: an intimate connection. *Trends Biochem.Sci.* 2000; 25: 215-21.
13. Fisenko V.P., ed. *Guide to experimental (preclinical) studying of new pharmacological substances. [Rukovodstvo po*

eksperimentalnomu (doklinicheskomu) izucheniyu novikh farmakologicheskikh veshchestv. Moscow; Minzdrav RF, ЗАО «ПА «Remedium»; 2000. (in Russian)

14. Galea V., De Bruin H., Cavasin R., McComas A.J. The number and relative size of motor units estimated by computer. *Muscle and Nerve*. 1991; 14: 1123-30.

15. Geht B.M. *Theoretical and clinical electromyography. [Teoreticheskaya i klinicheskaya elektromiografiya]*. Leningrad: Nauka; 1990. (in Russian)

16. MacIntosh B., Gardiner Ph., McComas A.J. *Skeletal muscle. Form and function*. 2th ed. Champaign: Human Kinetics; 1998.

17. Bouzat C., Barrantes F.J. Assigning function to residues in the acetylcholine receptor channel region. *Mol. Membr. Biol.* 1997; 14: 167-77.

18. Dodt C., Keyser B., Molle M. Acute suppression of muscle sympathetic nerve activity by hydrocortisone in humans. *Hypertension*. 2000; 3: 758-63.

19. Trush V.V., Sobolev V.I. Amplitude-Frequency's Dependence of M-Response of the Skeletal Muscle of Rats with

Experimental Hypercorticoïdizm. *Rossiyskiy Fyziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenov*. 2015; 101 (7): 829-42. (in Russian)

20. Braun S., Sarkozi E., McFerrin J. Hydrocortisone influences voltage-dependent L-type calcium channels in cultured human skeletal muscle. *J. Neurosci. Res.* 1995; 6: 727-33.

21. 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.

22. 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.

23. Trush V.V., Sobolev V.I. Influence of iatrogenic hypercorticoïdizm induced by long-term application of dexamethasone on power of muscular contraction of white rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60 (4): 39-46. (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 (г. Ялта), Россия, e-mail: v.sobolev@mail.ru

© Коллектив авторов, 2017
УДК 576.524, 57.053, 616-092.18

Московцев А.А.^{1,3}, Колесов Д.В.¹, Мыльникова А.Н.²,
Зайченко Д.М.¹, Соколовская А.А.¹, Кубатиев А.А.^{1,3}

Ответы эндотелиальных клеток на деформацию сдвига: механотрансдукция, клеточный стресс и адаптация

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

² ФГБОУВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», 125047, г. Москва, Миусская площадь, д.9

³ ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Москва

Эндотелиальные клетки, выстилающие стенки сосудов, являются одними из важнейших регуляторных элементов кровеносной системы. Непосредственно соприкасаясь с потоком крови, эти механочувствительные клетки способны детектировать свою деформацию через ее тангенциальный компонент (сдвиг) и составляющую, направленную по нормали к поверхности (растяжение). Деформация сдвига является ключевым индуктором комплекса сигнальных путей, опосредуемых тирозинкиназами, интегринами, ионными каналами, вовлекающих также мембранные липиды, гликокаликс и другие клеточные компоненты. На фоне достаточно большого количества данных о сигнальной трансдукции, в литературе меньше внимания уделено клеточной адаптации к сдвиговой деформации и сравнительно мало информации об участии генов стрессового ответа. Гидродинамические условия в определенных зонах сосудистой системы характеризуются значительной неоднородностью, что может приводить к ослаблению обратных связей, необходимых для поддержания гомеостаза в эндотелиальных клетках. Это может способствовать развитию заболеваний, например, таких, как атеросклероз. В обзоре обсуждаются новые аспекты и концепции, связанные с ответами эндотелиоцитов на сдвиговую деформацию и основные методы анализа эффектов сдвиговой деформации *in vitro*. **Цель исследования.** Обобщение современных данных о механизмах механочувствительности и механотрансдукции эндотелия. **Результаты.** В обзоре изложены основные механизмы механочувствительности клеток эндотелия, пути внутриклеточной передачи сигнала, рассмотрено вовлечение механизмов стрессового ответа клеток и адаптации. Обсуждаются эксперименты по изучению молекулярных основ механотрансдукции, в том числе белков и других молекул, вовлеченных в детектирование, передачу сигнала и клеточный ответ на сдвиговую деформацию.

Ключевые слова: эндотелий, сдвиговая деформация, механотрансдукция, клеточный стресс, адаптация.

Для цитирования: Московцев А.А., Колесов Д.В., Мыльникова А.Н., Зайченко Д.М., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. Ответы эндотелиальных клеток на деформацию сдвига: механотрансдукция, клеточный стресс и адаптация. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(4): 112–125.

DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8531

Для корреспонденции: Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр., лаб. регуляции агрегатного состояния крови, ФГБНУ НИИОПП Балтийская ул., 8, e-mail: bioinf@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, номер проекта 16-04-01807

Поступила 11.12.2016

Moskovtsev A.A.^{1,3}, Kolesov D.V.¹, Mylnikova A.N.²,
Zaychenko D.M.¹, Sokolovskaya A.A.¹, Kubatiev A.A.^{1,3}

Endothelial shear stress responses: mechanotransduction, cell stress and adaptation

¹ FSBSI Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315, Russia

² Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 9, Miusskaya sq., Moscow, 125047, Russia

³ Russian Medical Academy of Postdoctoral Education, Moscow, Russia

Endothelial cells lining the walls of blood vessels are one of the most important regulatory elements of the circulatory system. These mechanosensitive cells are in a direct contact with the flow of blood and able to detect deformation through its tangential component (shear) and the component directed along the normal to the surface (tension). Shear stress is the key inducer of the complex of signaling pathways mediated by tyrosine kinases, integrins, ion channels, involving also membrane lipids, glycocalyx and other cellular components. There are large amount of data on signal transduction in the literature, but less attention is paid to cellular adaptation to shear stress and there is relatively little information on the involvement of stress response genes in that process. Hydrodynamic conditions in certain zones of the vascular system are characterized by consid-

erable heterogeneity, which can lead to weakening of feedbacks necessary for maintaining homeostasis in endothelial cells. This can contribute to the development of diseases such as atherosclerosis. This review presents new aspects and concepts related to the responses of endotheliocytes to shear stress and, in addition, highlights the basic methods of analyzing the effects of shear stress *in vitro*. **Purpose of the study.** Generalization of modern data on mechanisms of mechanosensitivity and mechanotransduction of the endothelium. **Results.** The review outlines the main mechanosensitivity mechanisms of endothelial cells, the pathways of intracellular signaling, the involvement of mechanisms of cellular stress response and adaptation. There are descriptions of experiments in which the molecular basis of mechanotransduction is identified, including the determination of proteins and other molecules involved in detection, signal transduction, and cellular response to shear stress.

Keywords: endothelium, shear stress, mechanotransduction, cell stress, adaptation.

For citation: Moskovtsev A.A., Kolesov D.V., Mylnikova A.N., Zaychenko D.M., Sokolovskaya A.A., Kubatiev A.A. Endothelial shear stress responses: mechanotransduction, cell stress and adaptation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. (*Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal*). 2017; 61(4): 112–125. (in Russian). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8531

For correspondence: Aleksey A. Moskovtsev, PhD, Leading Researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «General Pathology and Pathophysiology»; 8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315, Russian Federation, e-mail: bioinf@mail.ru

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

Acknowledgments. This work has been supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR grant № 16-04-01807 A)

Information about authors: (сведения о регистрации на сайте — orcid, ассоциированном со Scopus)

Kubatiev A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8077-2905>

Received 11.12.2016

Введение

Сосудистая система, обеспечивающая активный массоперенос, — важное эволюционное приобретение, позволившее многоклеточным организмам преодолеть ограничения, связанные с низкой скоростью диффузии, и благодаря этому строить сложные ткани и органы с интенсивным метаболизмом. С другой стороны, регулирование работы сосудистой системы осложнено изменяющимися запросами различных тканей, неоднородностью гидродинамических условий, возникающей на протяжении сосудистого русла. Направленный пульсирующий поток находящейся под давлением крови в ветвящихся сосудах представляет собой сложную гидродинамическую систему, исследование которой сопряжено с рядом трудных вопросов, таких, как турбулентность и неньютоновский характер жидкости. В связи с этим исследование гидродинамических особенностей кровеносной системы млекопитающих, как одной из наиболее развитых систем у животных, представляет собой чрезвычайно актуальную проблему, так как она сосредотачивает в себе ряд пока еще недостаточно изученных решений по регуляции активного массопереноса, сформированных в ходе длительной эволюции.

Одними из важнейших регуляторных элементов кровеносной системы являются эндотелиальные клетки, выстилающие стенки сосудов. Эндотелиальные клетки в действующем сосуде находятся в поле сил, генерируемых потоком крови и компенсируемых упругими свойствами клеток сосуда и окружающих

тканей, а также давлением интерстициальной жидкости. Следует отметить, что упругие свойства стенок крупных сосудов артериального звена можно считать постоянными («пассивная эластичность»), в то время как эластичность стенок более мелких артерий может изменяться благодаря сократимым гладкомышечным элементам. Эти мелкие артерии, или артерии сопротивления, в существенной степени определяют артериальное давление. Интересно, что при синдроме Вильямса, который характеризуется синтезом укороченных форм эластина с некоторыми отсутствующими доменами, происходит сужение крупных артерий, вызванное аномальным разрастанием вокруг артерий гладкой мускулатуры.

Эндотелиоциты являются механочувствительными клетками: непосредственно соприкасаясь с потоком крови, они способны детектировать деформацию, возникающую в результате тока крови, ее нормальную составляющую, обусловленную гидростатическим давлением, и тангенциальный компонент (сдвиговая деформация, ориентированная по касательной к поверхности) [1, 2]. Механочувствительность необходима эндотелию для выполнения одной из своих важнейших функций — управления местным кровотоком. Для этого эндотелиальные клетки должны регистрировать направление и величину действующей в трех измерениях и меняющейся во времени механической силы, создаваемой потоком. Кроме того, клетки должны интегрировать полученную информацию для формирования своевременного ответа, выражающегося в пере-

стройке собственного функционирования (адаптации) и выработке управляющего воздействия на сократительные элементы сосуда. Для формирования ответа на механическое воздействие эндотелиальные клетки должны быть способны к кодированию величины и направления механического воздействия в химические сигналы, т.е. к механотрансдукции.

Фундаментальным свойством кровеносной системы является ее ветвление, которое, влечет за собой существенную неоднородность условий для эндотелиальных клеток. Атеросклеротические бляшки обычно развиваются в местах ветвлений и бифуркаций крупных артерий эластического и мышечного типов, где на очень коротких расстояниях происходит существенное изменение поперечного сечения сосудистого русла, а также в зонах с нелинейной геометрией — таких, как дуга аорты [3]. Кровоток в этих регионах имеет сложный пространственный и временной характер, для него свойственны низкая интенсивность сдвиговой деформации, реверсия направления на фоне колебаний давления, обусловленных сердечным циклом. Эндотелиоциты в определенных случаях, возможно, могут «воспринимать» подобные гидродинамические условия как патологические. Детальное понимание процессов рецепции, трансдукции и ответов клеток на механическое воздействие позволило бы уточнить роль гемодинамики в возникновении сосудистых заболеваний. Однако, несмотря на длительную историю исследований, до сих пор не существует консенсуса относительно того, какие процессы и структуры могут участвовать в механотрансдукции, и каков порядок их значимости в этом процессе.

Домены эндотелиальных клеток

Эндотелиоцит — поляризованная клетка, в которой можно выделить апикальный (люминальный), базальный и латеральные домены. Эндотелиальные клетки представляют собой интерфейс между кровью и тканью (стенкой сосуда), формируют фактически двумерную ткань и склонны к расплыванию на субстрате — базальной мембране [4], поддерживая при этом сравнительно небольшую высоту. Однако, в зависимости от типа эндотелия, его высота может сильно варьировать — в целом, хорошо известна как функциональная, так и морфологическая гетерогенность эндотелия.

Эндотелиальная клетка в определенном диапазоне действующих сил имеет упругие свойства и способность к обратимой деформации, т.е. может быть охарактеризована как твердое тело, реагирующее на изменение объема и формы. Однако такие компоненты клетки, как мембраны, обладают текучестью. В зависимости от величины действующей силы, деформиру-

ваться могут различные структуры клетки, что потенциально может формировать целый спектр клеточных ответов. Необходимо также отметить, что эндотелиоциты, как и все субстрат-зависимые клетки, т.е. растущие на «подложке», постоянно находятся в состоянии механического напряжения, связанного с поддержанием формы. Это напряжение возникает в результате взаимодействия цитоскелета с другими областями клетки, такими, как ядро, соседние клетки, места адгезии к матриксу (субэндотелиальному) [5].

Гликокаликс.

Строение и функции, участие в механорецепции

Первой, поверхностной структурой эндотелиального слоя, непосредственно граничащей с потоком, является гликокаликс. Он представляет собой гидратированный гелеобразный слой толщиной приблизительно 500 нм, состоящий из сульфатированных протеогликанов, гиалуронана, гликопротеинов, — полимерных молекул, которые формируют его матрицу, а также адгезированных к ней белков плазмы [см. обзор [6].

В экспериментах на мелких сосудах и капиллярах *m. Cremasteri* с использованием флуоресцеин изотиоцианат-меченого декстрана с молекулярной массой 70 кДа в качестве контрастирующего агента было показано, что высота гликокаликса в 500 нм характерна для капилляров и может существенно снижать «функциональный» диаметр сосуда, составляя 10%—20% его величины [7]. При движении эритроцита по сосуду расстояние между ним и стенкой сосуда растет при увеличении линейной скорости эритроцита, и эта величина в какой-то момент может быть больше высоты гликокаликса [7]. При остановке потока, эритроцит занимает весь просвет сосуда, видимо, деформируя гликокаликс; в противоположность этому лейкоциты и в динамических, и в статических условиях занимают весь просвет, по-видимому, также «сминая» гликокаликс, однако его толщина восстанавливается в течение 0,5 с после прохода лейкоцитов [7]. Мембраны эритроцитов довольно лабильны, и остается открытым вопрос о том, чем обусловлен столь быстрый коллапс гликокаликса при остановке эритроцита [6].

Таким образом, предполагается, что при остановке движения эритроцита происходит существенная компрессия гликокаликса, что может генерировать впоследствии значительно большую подъемную силу, чем предполагалось ранее [8]. Наличие силы отталкивания может объяснить отсутствие адгезии эритроцитов к плазмалемме эндотелия [8]. Характер изменений гликокаликса при остановке эритроцита согласуется с интересным феноменом так называемого «pop-out» (всплывания, подъема) эритроцита из гли-

кокаликса после возобновления движения и, затем, выше толщины гликокаликса при дальнейшем увеличении его скорости с предположительным формированием слоя между эритроцитом и гликокаликсом, который может выполнять функцию лубриканта. Была проведена интересная аналогия между скольжением лыжника по снегу и движением эритроцита по гликокаликсу [8]. Следует отметить важную для патогенеза многих сосудистых заболеваний относительную нестабильность гликокаликса: в ряде работ отмечалась быстрая его деградация при действии физических и химических факторов на эндотелий, при этом конечным действующим фактором, по-видимому, были активные формы кислорода [6].

Структура гликокаликса формируется «тангенциальными» компонентами, которые упрощенно можно представить лежащими в плоскости, параллельной стенке сосуда, а также компонентами, направленными по нормали к ней. Первые представляют собой гликозаминогликаны (ГАГ): гепарансульфат (ГС), который составляет от 50 до 90% ГАГ на поверхности эндотелиальных клеток, хондроитинсульфат, дерматансульфат, гиалуронан [6]. ГАГ гликокаликса, как известно, в основном несут отрицательный заряд и, за исключением гиалуронана, ковалентно ассоциированы с плазматической мембраной (см. ниже). Цепи гепарансульфата могут связывать широкий спектр внеклеточных лигандов с высокой аффинностью (K_D в диапазоне 1—100 нМ), при этом связывание довольно устойчиво к солям в физиологических концентрациях [9]. Гиалуронан — гораздо более длинный несulfатированный дисахаридный полимер, имеющий медиану молекулярных масс порядка 1000 кДа, он не имеет ковалентных связей с коровыми белками (см. ниже), а взаимодействует с рецепторами, например, CD44.

Компоненты, ориентированные по нормали к просвету сосуда, выполняют важную структурную функцию и представлены коровыми белками — синдеканами, глипиканами, ковалентно связанными с ГАГ. Эти два белковых семейства имеют ряд существенных отличий, среди которых организация их внеклеточных (экто) доменов. Эктодомены синдеканов — преимущественно вытянутые пролин-богатые структуры, которые имеют два сайта связывания ГАГ — на относительно большом отдалении от мембраны (для гепарансульфата) на N-конце и непосредственно у мембраны для хондроитинсульфата; эктодомены глипиканов — глобулярные структуры, богатые цистеином, имеющие от 3 до 4 областей связывания ГАГ в непосредственной близости от мембраны [9]. В составе синдеканов — трансмембранные домены, в то время как глипиканы присоединены к одному «листка» мембраны посредством гликозилфосфатидилинозитольного (ГФИ) «якоря», т.е. они не пенетрируют

липидный бислой [9]. ГФИ «привязывает» глипикан к липидным рафтам и, в частности, кавеолам (100-нанометровым полостям, формируемым плазмалеммой, богатой холестерол-связывающим белком кавеолином-1).

Вероятно, топологические отличия эктодоменов синдеканов и глипиканов определяют и их функциональную диверсификацию. Так, например, экспрессия синдеканов, но не глипиканов, снижает способность опухолевых клеток к инвазии в коллагеновый гель (коллаген I типа) [10].

В гликокаликсе участвуют также различные трансмембранные гликопротеины, экстраклеточные домены которых ковалентно связаны с ветвящимися олигосахаридами с концевыми сиаловыми кислотами — 9-углеродными моносахаридами, диссоциирующими при физиологическом pH, что усиливает суммарный отрицательный заряд гликокаликса [6].

Трехмерная сеть ГАГ гликокаликса может выступать в виде депо для различных лигандов и модуляторов функционального состояния эндотелия. Следует еще раз подчеркнуть, что гликокаликс представляется динамичной структурой со многими «степенями свободы». Так, вариации ионной силы, pH, состава катионов приводят к конформационным перестройкам полимеров гликокаликса и изменениям их взаимодействия. Кроме того, в результате действия ряда ферментов, может иметь место так называемый шеддинг, или «срезание» эктодоменов. Конститутивный протеолитический шеддинг эктодоменов синдеканов с поверхности клеток происходит как в культуре, так и в физиологических условиях, шеддинг эктодоменов глипиканов также имеет место в культуре клеток, но меньше известно о ситуации с эктодоменами глипиканов *in vivo* [9].

Важным аспектом функционирования гликокаликса является то, как коровые белки могут передавать сигналы. С учетом вышеописанных топологий C-концевых доменов (располагающихся в структурах клетки), они делают это неодинаково. Цитоплазматические домены трансмембранных синдеканов взаимодействуют с белками цитоскелета и сигнальными молекулами; глипиканы же могут передавать информацию только через ассоциацию с трансмембранными белками, имеющими сигнальную функцию или через взаимодействие с липидными мессенджерами [9].

Сравнительно недавно была установлена ультраструктурная организация гликокаликса эндотелия и его связи с актиновым цитоскелетом. Доминирующим мотивом в нем оказалась квазипериодическая структура — гексагональная решетка с расстоянием в 20 нм между заякоренными в клеточных структурах коровыми белками, которые имеют диаметр около 10 нм без учета цепей полисахаридов и ГАГ, образующих кустоподобные структуры, последние как раз и

формируют типичный шаг в 20 нм [6, 11]. Предполагается, что эта решетка упорядоченных волокон гликокаликса может функционировать как молекулярное сито. Описанная структура находится в связи с цитоскелетом эндотелия так, что фокусы цитоскелета образуют с цитоплазматической стороны регулярную решетку с расстоянием 100 нм.

Было предложено несколько моделей, описывающих свойства и функционирование эндотелиального гликокаликса. Согласно онкотической модели, коллоидно-осмотическое давление, возникающее при адсорбции белков плазмы на гликокаликсе, достаточно для исключения эритроцитов из зоны гликокаликса, т.е., функционирование и восстановление гликокаликса в большей степени зависят от сил химической природы, а не механических. В эластогидродинамической модели жесткость на изгиб волокон гликокаликса обуславливает функционирование гликокаликса в качестве сита и для противодействия сдвиговой деформации [6]. В механо-электрохимической модели восстановление гликокаликса происходит из-за возникающего градиента электрохимического потенциала, который включает в себя химический и электростатический компоненты.

Существующие данные указывают на то, что поток в слое гликокаликса незначителен [6], и величина сдвиговой деформации на уровне мембраны весьма мала. Кроме того, нарушение структурной целостности гликокаликса приводит к полной отмене химической сигнализации и реорганизации цитоскелета при действии сдвиговой деформации, что указывает на важнейшую роль гликокаликса в механотрансдукции [12].

Механотрансмиссия —

передача сил гликокаликсом на цитоскелет

Гликокаликс представляется важной структурой эндотелия, осуществляющей передачу механического напряжения, возникающего при действии потока, на внутренние структуры клетки и, прежде всего, цитоскелет. Передача механического напряжения на цитоскелет сопровождается его перестройками и активацией ряда сигнальных путей.

Ключевыми элементами в процессе передачи деформации от гликокаликса к цитоскелету выступают [12]:

- трансмембранные протеогликаны гликокаликса — синдеканы, связанные с актиновыми волокнами (F-актином);
- кортикальная актиновая сеть (actin cortical web, ACW) на люменальной стороне эндотелия;
- адгерентные клеточные контакты на латеральных сторонах клеток и связанные с ними адгезивные пояски, плотные периферические актиновые полоски (dense peripheral actin band, DPAB), формирующие «опору» для ACW;

- базальные фокальные контакты и базальные протеогликаны, связанные с интегринами люменального домена и межклеточными контактами латеральных доменов посредством стрессовых волокон.

В исследовании [12] путем изменения состава перфузируемой среды (добавление бычьего сывороточного альбумина (БСА) или эмбриональной телячьей сыворотки), а также с помощью гепариназы была показана связь между ACW, DPAB и альфа-актинин-содержащими стрессовыми волокнами с вовлечением опосредующих связывание белков, таких как винкулин, паксиллин и других [12]. Следует отметить, что гепариназа способна существенно ингибировать продукцию эндотелием оксида азота, вызванную сдвиговой деформацией (СД). Предполагается, что при превышении пороговой величины сдвиговой деформации, кортикальная сеть ACW, связанная с гликокаликсом, растягивает адгерентные контакты, что вызывает разборку актиновых структур, связанных с ними, т.е. фактически имеет место разъединение адгерентных контактов и плотных периферических актиновых полосок. Высвобожденный актин участвует в образовании стрессовых волокон, включая базальные, кроме того, формируются дополнительные фокальные адгезии. В зонах высоких сдвиговых деформаций были зарегистрированы разрывы плотных контактов. При деградации гликокаликса на фоне действия гепариназы III не наблюдалась перестройка актинового цитоскелета, перераспределение винкулина, разрывы плотных и щелевых контактов в потоке [12]. Описанные изменения имели место в потоке в среде с 10% эмбриональной телячьей сывороткой, а также в среде с добавлением 1% БСА, что обеспечивало, по мнению авторов, нативное состояние гликокаликса. Для оценки состояния плотных и щелевых контактов были использованы антитела к белкам ZO-1 и Сх43, при действии сдвиговой деформации наиболее заметными были деформации и разрывы визуализируемых участков с ZO-1 [12].

Предполагается, что сигнальный компонент при передаче сдвиговой деформации в эндотелии может существенно различаться в случае непосредственного участия апикальной плазмалеммы на фоне коллапса гликокаликса или полноценного вовлечения гликокаликса. Действительно, могут отличаться механорецепторы и задействованные сигнальные пути. При участии гликокаликса важными «передатчиками» могут выступать синдеканы (синдекан-I) благодаря хорошо развитым экстраклеточным доменам и наличию цитоплазматического домена, связывающего фибриллярный актин [12].

Плазмалемма имеет низкую структурную жесткость, в потоке может наблюдаться эффект деформации мембран в виде «ряби», но маловероятно, что она может выступать эффективным посредником в передаче механического воздействия на ACW [12].

Тем не менее, важно отметить, что с точки зрения механики участие или неучастие гликокаликса, по-видимому, мало влияет на результирующую силу, приложенную к базальной поверхности эндотелия в начальных фазах воздействия сдвига. Однако впоследствии это может иметь более существенное значение в связи с опосредуемым механосенсорами и сигнальными путями включением адаптивных механизмов, компенсирующих силы деформации.

При воздействии сдвиговой деформации в гликокаликсе был отмечен ряд изменений. Было показано, что в статических условиях гепарансульфат покрывает большую часть апикальной поверхности RFPEC (rat fat pad endothelial cells) клеток, при прикладывании сдвиговой деформации величиной 1,5 Па в течение 10 мин он перемещается по потоку к краям клеток и кластеризуется на границах клеток через 30 мин [13]. После 24-часового воздействия ГС снова появляется в центральных регионах клеточной поверхности, однако кластеризация на границах по-прежнему сохранялась, при этом содержание ГС выросло на 43% по сравнению со статическим контролем, что было обусловлено ростом его синтеза [13]. Следует отметить, что существенного изменения морфологии не происходило при длительном воздействии — эндотелиальные клетки поддерживали характерный вид «бульжонной мостовой» в отличие от ВАЕС (Bovine aortic endothelial cells) клеток, принимавших веретенообразную форму, ориентированную по потоку. ВАЕС также демонстрировали похожее перераспределение ГС при действии как краткосрочной (30 мин), так и продолжительной (24 ч) сдвиговой деформации [13].

Распределение хондроитинсульфата при краткосрочном действии сдвиговой деформации существенно не отличалось от статического контроля [13]. При 24 ч-сдвиговой деформации границы клеток становились менее однородными, «пенетрированными». Распределение глипикана не менялось при действии как краткосрочной, так и 24 ч-сдвиговой деформации, однако наблюдалось падение его содержания на 30 мин, а затем повышение на 50% по сравнению со статическим контролем [13]. Заметных изменений в распределении синдекана-1 при действии сдвиговой деформации не было отмечено, его уровень за 24 ч вырос на 63% [13]. Также было обнаружено существенное увеличение содержания кавеолина-1 в центре апикальной части клеток при продолжительной сдвиговой деформации на фоне его синтеза и перемещения от базальной части к апикальной [13].

Сдвиговая деформация вызывала перераспределение ганглиозида GM1 к границам клеток и рост его содержания, что характеризовало «поведение» липидных мембранных рафтов [13].

Наиболее существенные изменения при действии сдвиговой деформации были отмечены в актиновом

цитоскелете. В статических условиях в клетках хорошо визуализировались периферические актиновые полоски по краям клеток. СД приводила к формированию стрессовых волокон, параллельных ближайшему краю клетки на фоне существенного увеличения его синтеза уже на ранних временах; при этом отмечалось образование ламеллиподий и филоподий, а плотные периферические полоски постепенно исчезали [13]. Дезорганизация актина с помощью цитохалазина D блокировала восстановление гепарансульфата на апикальной поверхности клеток при 24-часовом действии сдвиговой деформации [13].

Таким образом, в действии сдвиговой деформации на цитоскелет эндотелиальных клеток, можно выделить несколько фаз. В краткосрочном периоде происходит актин-независимая кластеризация на границах клеток «по потоку» липидных рафтов с заякоренным глипиканом, при этом нет заметных изменений в распределении трансмембранных синдеканов, связанных с актиновым цитоскелетом, а также кавеол, так как большая по сравнению с мембраной структурная жесткость цитоскелета обеспечивает противодействие сдвиговой деформации на начальном периоде воздействия [13]. Тем не менее, по-видимому, происходит передача и перераспределение силы по цитоскелету, что может приводить к сравнительно быстрым перестройкам цитоскелета, в частности, к исчезновению периферических актиновых полосок в базальном домене клеток, однако, при их сохранении в апикальной части. Наиболее существенным изменением актинового цитоскелета является образование стрессовых волокон, вполне заметных через 30 мин и ориентированных параллельно ближайшему краю клеток с дальнейшей тенденцией увеличения их количества и более равномерного распределения на длительных сроках сдвиговой деформации [13].

Важным аспектом адаптации клеток к сдвиговой деформации являются структурные изменения в мембране. Кроме упомянутой выше ранней кластеризации заякоренных в липидных рафтах глипиканов, после 24-часового воздействия было обнаружено существенное увеличение экспрессии кавеолина-1 в апикальном стеке в центральной части клеток [13]. Восстановление распределения глипикана-1, увеличение экспрессии кавеолина и числа кавеол в центральной части клеток может быть согласовано с перестройками актинового цитоскелета, так как последний стабилизирует структурный белок кавеол — кавеолин-1, а также трансмембранный синдекан-1 [13].

В целом, при длительном действии сдвиговой деформации было отмечено довольно значительное увеличение синтеза глипикана, синдекана, кавеолина, актина [13], что свидетельствует о существенных длительных изменениях генной экспрессии.

Механотрансмиссия. Клеточные контакты

Сдвиговая деформация представляет собой комплексное воздействие, и эндотелиальная клетка обладает системой разнородных механосенсоров, необходимых ей для интеграции и правильной «интерпретации» паттернов и действующих на клетку силовых полей. Сопряженный с гликокаликсом цитоскелет связывает также межклеточные контакты и соединения клетки с внеклеточным матриксом в единую систему перераспределения механических нагрузок. Ключевыми участниками этой системы являются фокальные адгезии (базальный домен), плотные и адгезивные контакты (латеральные домены). Таким образом, механическое усилие, приложенное к апикальной поверхности клеток, перенаправляется на указанные структуры, а также инициирует ряд химических сигналов (см. ниже).

Фокальные адгезии (ФА) — сложные белковые комплексы, важным участником которых является интегрин, обеспечивающие взаимодействие между актиновым цитоскелетом и внеклеточным матриксом. Кроме того, это взаимодействие регулирует ряд сигнальных путей, которые, таким образом, являются интегрин-зависимыми.

Среди них Rho GTPаза — опосредованный путь. Было показано наличие двух фаз в регуляции активности Rho на фоне активации интегрин $\alpha_v\beta_3$ [14]: после увеличения сдвиговой деформации с 0 до 1,2 Па на культуре эндотелиальных клеток бычьей аорты после короткого 2-минутного лаг-периода наблюдалось снижение активности Rho в течение интервала 5—15 мин с последующим ростом и достижением пика на 60-й минуте действия СД. Начальное снижение активности соответствовало снижению числа стрессовых волокон, повышение — росту числа последних, что определялось путем химической фиксации клеток и окраской фаллоидином, меченым родамином [14]. Увеличение числа стрессовых волокон совпадало со значительным выравниванием клеток по потоку, однако, выравнивание в целом требует более продолжительного времени. Следует отметить, что Rho активность снизилась на 120-й мин, хотя актиновые стрессовые волокна сохранялись. Авторы предполагают, что максимум ее активности необходим на этапе сборки стрессовых волокон, более низкой активности достаточно для их поддержания. В целом, наблюдаемая фазность изменений активности Rho была очень похожа на процессы распластывания клеток по фибронектину — начальное падение активности в фазе активного распластывания, когда цитоскелет высокодинамичен; максимум активности, когда стрессовые волокна и фокальные адгезии собраны, и постепенное возвращение к базальному уровню [15]. Активация интегрин $\alpha_v\beta_3$ наблюдалась на базаль-

ной поверхности клеток — авторы предполагают, что эндотелиальные клетки выработали механизмы по подавлению экспрессии высокоаффинных интегрин на люменальной (апикальной) поверхности по причине того, что могли бы быть тромбогенными. Сдвиговая деформация вызывала также образование ламеллиподий.

Поведение клеток при действии сдвиговой деформации имеет ряд общих черт с процессами клеточной адгезии, таких как профиль активации интегрин-зависимых сигнальных каскадов. При адгезии клеток в начальной фазе активации интегрин и вовлечения новых интегрин, перестройка зон фокальной адгезии не имеет определенной пространственной направленности в отличие от перестройки ФА по потоку при СД [16, 17].

Возникновение зоны ФА подробно описано в обзоре [17]. Образование раннего адгезивного контакта, т.е. первичного взаимодействия между интегрин и матриксом, происходит независимо от силы, но после связывания интегрин присоединяются к актиновому цитоскелету, что индуцирует талин-опосредуемое увеличение силы адгезии на 2 пН; затем происходит активация GTPаз Rac и Cdc42 с образованием ламеллиподий и филоподий и трансформацией раннего контакта в фокальный комплекс, последний процесс характеризуется рекрутированием паксиллина, винкулина, при этом уровень винкулина коррелирует линейно с величиной силы [17].

Фокальные комплексы — предшественники сайтов фокальной адгезии. Последние представляют собой удлиненные структуры, образуемые при активации Rho: ее эффектор — Rho-киназа — фосфорилирует легкие цепи миозина, рост величины силы приводит к увеличению плотности интегрин, рекрутированию дополнительных структурных белков адгезии, удлинению сайта адгезии в направлении действующей силы [17]. Зоны ФА сравнительно недавно были изучены с применением микроскопии сверхвысокого разрешения — было установлено [18], что интегрин и актин в сайте ФА разделены по вертикали 40-нм коровым слоем, который в свою очередь состоит из многих слоев:

- «сигнального слоя» из цитоплазматических доменов интегрин, киназ фокальной адгезии, паксиллина;
- промежуточного слоя механической трансдукции из талина и винкулина;
- актин-регулирующего слоя из зиксина, фосфоротеина, стимулирующего вазодилатацию и альфа-актинина.

В целом, в формировании сайтов фокальной адгезии могут участвовать более 150 белков, обозначаемых вместе как адгезом [18].

Важную роль в перестройке функционирования клетки при действии сдвиговой деформации также играют другие интегрин-зависимые сигнальные пути, такие, как тесно связанный с Rho-опосредуемым путем FAK and c-Src сигнальные ветви, MAP-киназы, а также ERK, JNK, и NF κ B-опосредуемые сигнальные пути [17]. Кроме того, было показано, что сдвиговая деформация вызывает активацию рецептора фактора роста сосудов VEGF Flk-1 на поверхности эндотелиальных клеток, причем активация детектируется уже на 1-й мин, достигает пика на 10—15-й мин и возвращается к базовому уровню через 30 мин [19]. Тем не менее, хотя активация Flk-1 не зависит от собственных лигандов, блокирование интегринов деактивирует Flk-1 при сдвиговой деформации [20], что позволяет причислить Flk-1 к интегрин-зависимым путям.

Следует отметить, что в экспериментах по изучению сдвиговой деформации создаются силы порядка 1 Па, что примерно в 500 раз меньше, чем тянущие силы при адгезии и образовании ламелиподий [17]. Адгезивные контакты, как правило, составляют всего около 10% площади базальной поверхности, и, если сила эффективно и полностью передается на базальную поверхность, то в зонах ФА должно наблюдаться десятикратное увеличение действующей на клетку силы [17].

Несмотря на детальные исследования действия сдвиговой деформации на клетку, интенсивно проводимые со второй половины XX века и установление активируемых при СД сигнальных каскадов, вопрос о том, как осуществляется конверсия механического стимула в химический сигнал, оставался длительное время нерешенным. В 2009 году с использованием магнитных твизеров, микроскопии полного внутреннего отражения и атомной силовой микроскопии было установлено, что силы в диапазоне физиологических значений вызывают растягивание молекул талина, что открывает в них криптические сайты связывания винкулина — таким образом осуществляется механотрансдукция в зонах ФА [21].

Как было сказано выше, важную роль в перераспределении механических усилий играют межклеточные контакты: действительно, эндотелиальные клетки образуют единую ткань — эндотелий, который, как предполагается, представляет собой не просто сумму свойств клеток, а приобретает ряд дополнительных важных особенностей, обусловленных кооперативными эффектами клеток.

Логику функционирования ФА при сдвиговой деформации можно было бы перенести и на межклеточные контакты, однако, для последних есть ряд особенностей. Основными для соседних эндотелиальных клеток служат плотные, щелевые и адгерентные кон-

такты. Плотные контакты (ПК) выполняют барьерную функцию, управляя проницаемостью эндотелия, и, будучи непроницаемыми или малопроницаемыми для жидкости, регулируют диффузию ряда соединений, что важно для функционирования гемато-тканевых барьеров, в частности, гематоэнцефалического. Сдвиговая деформация модулирует экспрессию белков, участвующих в образовании ПК, что может способствовать, например, увеличению проницаемости эндотелия.

Адгерентные контакты чувствительны к большому диапазону действующих сил и играют значительную роль в механотрансдукции и перераспределении механической нагрузки на соседние клетки. Выше было отмечено сходство характера перестроений зон ФА с изменениями в клеточных контактах при действии механических сил на клетку — действительно, адгерентные соединения усиливаются в ответ на натяжение [22], при этом происходит увеличение плотности кадгерина и винкулина.

Специфичный для эндотелия кадгерин — VE-кадгерин (VE-cadherin) — через свой цитоплазматический домен связывается с β -катенином или γ -катенином, что, в свою очередь, рекрутирует в комплекс α -катенин — важный для механотрансдукции белок, способный взаимодействовать с рядом актин-связывающих белков, таких, как винкулин, α -актинин, афадин, формин, EPLIN, ZO-1 [23], при действии механических сил молекула α -катенина растягивается, демаскируя сайт связывания винкулина.

Еще одним важным механопреобразователем, относящимся к межклеточным контактам, является PECAM-1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule 1), также известный как CD31 — гликопротеин суперсемейства иммуноглобулинов, обильно представленный на поверхности эндотелиальных клеток. Для PECAM-1 лигандом выступает другая молекула PECAM-1 [24], за счет чего обеспечивается установление контактов между клетками. Однако лигандами PECAM-1 могут выступать и интегрин α v β 3, CD177 и ряд других молекул [24]. Цитоплазматическая часть PECAM-1 включает в себя 2 иммунорецепторных тирозиновых ингибиторных мотива, которые служат сайтами связывания тирозиновых фосфатаз. Тирозиновые и сериновые/треониновые остатки этих внутриклеточных областей PECAM-1 могут фосфорилироваться [24], кроме того, цитоплазматическая часть PECAM-1 связывается с β -катенином или γ -катенином [25], т.е. схожим с VE-кадгеринном способом может передавать усилие на цитоскелет.

В эндотелиальных клетках сдвиговая деформация приводит к фосфорилированию тирозинов PECAM-1, что способствует увеличению степени ассоциации PECAM-1 и эндотелиальной NO-синтазы eNOS

[26]. Фосфорилирование тирозинов PECAM-1 модулирует активацию Akt и eNOS [26]. Вообще, с началом действия сдвиговой деформации продукция NO возрастает в диапазоне от двух до четырехкратного превышения базального уровня и поддерживается на всем протяжении действия сдвиговой деформации, при этом в активации eNOS можно выделить две фазы: начальный Ca^{2+} -зависимый пик с последующим низким плато, которое уже не зависит от возрастающего уровня Ca^{2+} [26]. Вторая фаза роста продукции NO связана с фосфорилированием eNOS киназами Akt и PKA. При действии сдвиговой деформации степень физической ассоциации между PECAM-1 и eNOS не возрастает монотонно, а наблюдается похожая фазность: между 15-й и 60-й секундами действия сдвиговой деформации, т.е. в фазу кальций-зависимого роста продукции NO, наблюдается диссоциация, а затем, с 5-й до 60-й минуты — устойчивый рост связывания [26]. На наш взгляд, данный пример может иллюстрировать принцип интеграции информации в сигнальных системах клетки при действии сдвиговой деформации. Недавно с помощью разработанных биосенсоров на PECAM-1 и VE-кадгерин на основе Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET) было показано, что в статической культуре эндотелиальных клеток ВАЕС VE-кадгерин в составе межклеточных контактов находится под действием значительной силы натяжения, действующей со стороны миозина, при этом натяжение не было зафиксировано для молекул VE-кадгерина вне клеточных контактов [27]. Сдвиговая деформация вызывала быстрое (менее чем через 30 с) снижение силы натяжения VE-кадгерина, однако натяжение увеличивалось в комплексах PECAM-1, локализованных в местах межклеточных контактов, причем в статических условиях в них значимых сил не было зарегистрировано [27]. СД приводила также к увеличению связывания PECAM-1 и виментина, что согласуется с вышеуказанными работами, показавшими ассоциацию PECAM-1 и связывающих виментин белков, таких, как γ -катенин [27]. Таким образом, PECAM-1 и VE-кадгерин показали согласованную реакцию на сдвиговую деформацию, тем не менее, речь о полном сопряжении, по-видимому, не идет, так как нокдаун виментина блокировал рост силы на комплексах PECAM-1 при СД, но не влиял на изменения в VE-кадгерине [27]. Это сравнительно недавнее исследование подтверждает концепцию передачи усилия через цитоскелет на межклеточные контакты. Однако ставится под сомнение пассивный характер этой передачи: силы межклеточного и внутриклеточного натяжения в эндотелиальных клетках при действии ламинарного потока на порядок больше, чем необходимо для пассивного уравни-

вания сил сдвига [28]. Предполагается, что существует механосенсор выше цитоскелетных белков и белков контактов, низкоинтенсивный сигнал от этого сенсора может индуцировать перенос более мощного усилия миозина на PECAM-1, что будет способствовать усилению сигнала [27]. Помимо того, что схемы усиления сигналов часто встречаются в биохимических путях [27], разобщение передачи механических сил по цитоскелету с увеличением роли химических сигналов может способствовать, по-видимому, детектированию сдвиговой деформации в более широком диапазоне величин.

Механотрансдукция. Ионные каналы

В качестве прямых механосенсоров может выступать ряд других элементов эндотелия. Например, среди самых ранних событий, возникающих при действии СД, можно отметить активацию ионных каналов. Механочувствительные ионные каналы рассматриваются в качестве непосредственных сенсоров сдвиговой деформации; хотя эндотелиальные клетки не являются возбудимыми, не экспрессируют высокие уровни потенциалзависимых каналов и не отвечают распространением волны деполяризации или гиперполяризации, изменение ионного состава при действии сдвиговой деформации оказывает существенное действие на функции эндотелия [29]. Тем не менее, соседство эндотелиальных клеток с возбудимыми мышечными клетками, функционирование которых в значительной степени зависит от ионных каналов, затрудняет анализ прямых эффектов сдвиговой деформации на ионные каналы эндотелия.

Можно перечислить несколько ионов, «отвечающих» на действие сдвиговой деформации: кальций, калий, натрий, хлорид-ионы. Уже упоминавшиеся выше ионы кальция, поступающие из внеклеточной среды и из внутриклеточных депо, играют роль в активации eNOS и, соответственно, вазодилатации, а также других важных процессах, регулирующих состояние эндотелиальной клетки. Эндотелиальные клетки за счет щелевых контактов могут электрически сопрягаться с гладкомышечными клетками, что, предположительно, формирует дополнительную систему управления сокращением последних [29, 30]. С учетом частой вовлеченности кальция в сигнальные процессы в качестве вторичного мессенджера, установление первичного сенсорного звена, чувствительного к сдвиговой деформации и перекодирующего информацию о сдвиговом воздействии в изменения концентрации кальция, осложнено непрямыми эффектами. Однако, ввиду сложной динамики концентрации кальция в цитоплазме, существования «волн» кальциевой концентрации, этот катион представляется веро-

ятым посредником в рецепции эндотелиальными клетками сложных гидродинамических паттернов, например, осциллирующий поток.

Калий также предполагается важным катионом, участвующим в детектировании эндотелиальными клетками СД. Было показано, что экспрессируемый на высоком уровне эндотелиальными клетками калиевый канал Kir2.1 является компонентом раннего ответа на СД [31], и он может опосредовать возрастающий ток ионов калия. Однако в указанной работе использовался рекомбинантный белок Kir2.1, специфическое ингибирование ввиду отсутствия высокоспецифичных блокаторов не применялось [29], что затрудняет анализ прямых эффектов и взаимодействия с другими сигнальными путями.

Сравнительно недавно значительное внимание в связи с механорецепцией привлекли белки семейства Piezo. Белок Piezo-1 рассматривается в качестве первичного механочувствительного ионного канала, действие сдвиговой деформации на который сопряжено с его активацией [см. обзор 32].

Адаптация и клеточный стресс при сдвиговой деформации

«Острое» начало действия сдвиговой деформации влечет за собой последовательность процессов, происходящих в эндотелиальной клетке в различном временном масштабе. Ранними событиями в этой последовательности являются изменения ионного состава, опосредуемые ионными каналами; передача механической силы на различные части клетки, главным образом посредством цитоскелета. В качестве механосенсора может выступать весь цитоскелет эндотелиальной клетки с ассоциированными сигнальными каскадами, активирующимися в определенных «горячих» точках [26]. Эти сигнальные системы участвуют в трансдукции механической деформации и, по-видимому, формируют специфические для данного набора сил комбинации сигнальных молекул разной химической природы, транскрипционных факторов, кодируя информацию о сдвиговой деформации и передавая ее в ядро. Активирующаяся в ответ на это экспрессия генов формирует долговременные изменения в цитоскелете, направленные на адаптацию клетки к механической нагрузке. Следует отметить, что если на эндотелий действует ламинарный и однонаправленный поток, активность сигнальных систем возвращается через некоторое время к базовому уровню. Это может быть связано с десенситизацией активности механочувствительных ионных каналов, восстановлением низкого уровня цитоплазматического кальция в связи с обратным захватом во внутриклеточные депо или экспортом во внеклеточное пространство [5].

В местах сосудистого русла со сложной гидродинамикой в виде реверсивных течений, турбулентности не наблюдается падения активности сигнальных систем, ассоциированных со сдвиговой деформацией, что может приводить к индукции провоспалительных путей в эндотелии. В этих регионах эндотелий даже в норме может экспрессировать на низком уровне маркеры воспаления и более предрасположен к развитию атеросклероза — так, у здоровых свиней [33] обнаруживалась повышенная активация провоспалительного пути, опосредуемого транскрипционным фактором NFκB, а также снижение экспрессии синтазы оксида азота. Предполагается, что состояние эндотелия в подобных зонах нефизиологично [3], т.е. постоянная стимуляция сигнальных путей может формировать патологический сигнал. Эндотелий при этом оказывается более проницаемым для макромолекул, более доступным для адгезии моноцитов, также в нем более выражена пролиферация [3].

Эндотелий в зонах развития атеросклероза экспрессирует маркеры клеточного стресса, в частности, стресса эндоплазматического ретикулама. Так, в сформировавшихся очагах атеросклеротических поражений в сосудах регистрировали повышенную экспрессию шаперона GRP78 [34]. Высокая экспрессия этого шаперона, а также активация других путей клеточного стресса обнаруживалась в фиброзных бляшках и особенно их покрышках у аполипопротеин Е-дефицитной мыши с развившейся гипергомоцистеинемией [35]. Было высказано предположение [36], что фракция GRP78, локализованная на мембране эндотелиальных клеток, связывает и ингибирует тканевой фактор, что может выполнять защитную функцию при развитии атеросклероза. Однако, следует отметить, что клеточный стрессовый ответ вовлечен в развитие многих патологий в качестве первичной реакции клетки на нарушение гомеостаза в результате прямого действия патогена, и как вторично активируемый ответ в нефизиологических условиях. Экспрессия GRP78 была показана на всех стадиях развития атеросклероза, включая ранние, предшествующие накоплению холестерина [37]. Это указывает на то, что могут существовать условия, приводящие к развитию клеточного стресса (стресса ЭПР) до начала формирования повреждения, и специфические гидродинамические условия, по-видимому, могут рассматриваться в качестве них [37, 38]. В работе [38] у мышей была показана увеличенная экспрессия GRP78 в зоне внутренней части дуги аорты, а также у 8-недельных ApoE^{-/-} мышей в местах ответвления межреберных артерий — для всех этих зон характерны специфические гидродинамические условия, и они являются местами, наиболее подверженными развитию атеросклероза. Все это позволило предположить роль предрас-

полагающей к развитию атеросклероза сдвиговой деформации в индукции экспрессии маркеров стресса ЭГР [38]: по мнению авторов, низкая интенсивность сдвиговой деформации и нестабильное направление потока, возникающие в зонах ветвления сосудов или местах с выраженной нелинейной геометрией, способны индуцировать клеточный стресс. В данном *in vitro* исследовании использовались два профиля сдвиговой деформации:

- *атеропротективный* профиль воздействия — осциллирующая во времени СД в диапазоне 1—4 Па с пиком 4 Па, длящемся около 300 мс;
- *способствующий развитию атеросклероза* профиль — *низкая СД, осциллирующая в диапазоне от 0.2 Па и ниже.*

Согласно данным, представленным в работе [38], способствующая атеросклерозу СД приводила к стабильному росту уровня белка GRP78 по сравнению с атеропротективным профилем, где после краткосрочной 4-часовой фазы подъема его уровень возвращался к контрольным значениям. Причем уровень мРНК GRP78 при атеросклероз-ассоциированной СД после краткосрочного повышения снижался к 16 часам, как и в случае атеропротективной СД. Авторы предполагают преимущественную стабилизацию белка GRP78, но не мРНК при действии способствующей атеросклерозу СД. Увеличение уровня GRP78 зависело от СД-активируемой киназы p38, которая, в свою очередь, в существенной степени зависела от интегрин $\alpha 2\beta 1$ [38]. Авторы указывают, что опосредуемые интегринными антиапоптотические сигналы от внеклеточного матрикса модулируются шаперонами, к семейству которых принадлежит и GRP78.

В недавней работе [39] показано, что белок теплового шока 70 (heat shock protein 70, Hsp70) регулирует активацию $\alpha IIb\beta 3$ интегрин тромбоцитов, секрецию тромбоцитами гранул и агрегацию, а ингибирование тромбоцитарных белков Hsp70 блокирует агрегацию и секрецию в ответ на коллаген-ассоциированные пептиды (CRP). *Ex vivo* фармакологическое ингибирование Hsp70 в цельной крови предотвращает образование тромбоцитарных агрегатов на коллагене в потоке.

Нами с использованием микрофлюидной модели сосуда и эндотелиоцитоподобных клеток EA.hy926 получены данные об увеличении экспрессии GRP78 в клетках в зонах с высокой интенсивностью сдвиговой деформации. Интересно, что в работе [38] высокий уровень GRP78 регистрировался в бляшке ApoE-/- мыши и особенно в ее покрышке. Бляшка суживает просвет сосуда, увеличивая величину сдвиговой деформации. Однако в этом случае нельзя исключать и вторично-обусловленного характера повышения экспрессии GRP78, т.е. участия в индукции стресса эндоплазматического ретикулаума других факторов.

Несмотря на накапливающиеся в последнее время данные об экспрессии в эндотелии генов стрессового ответа, таких, как шаперон GRP78, в участках сосудистого русла со сложной гидродинамикой, пока остаются неясными причины наблюдаемого роста экспрессии. Как было отмечено выше, передача механической деформации в эндотелии на цитоскелет с вовлечением межклеточных контактов, гликокаликса, фокальных адгезий включает в себя конформационные изменения белков, таких, как α -актинин или талин, а именно, частичное их разворачивание с экспонированием скрытых сайтов связывания для взаимодействующих с ними белков [21]. В целом, подобные «растяжения» белков играют важную роль в механотрансдукции [40, 41], может происходить даже разворачивание белков [42]. В начальный момент действия силы ее перераспределение по цитоскелету имеет неравномерный характер, и нельзя исключать того, что при конформационном переходе белка в «растянутое» состояние при превышении усилия может происходить разворачивание белка с потерей им нативной конформации. Это похоже на действие стрессорных факторов на эндотелий, таких, как температура или химические соединения [43]. Разворачиванию могут быть подвержены, вероятно, и экстраклеточные домены мембранных белков. В такой ситуации клетка может увеличивать синтез шаперонов для рефолдинга подобных белков. Кроме того, при адаптации к СД может происходить общий рост синтеза белка, что неизбежно потребует больше шаперонов и фолдаз для правильного сворачивания белков, в том числе их экстраклеточных частей. Интересно отметить, что ранее указанное несоответствие, а именно, существенное превышение сил, действующими в норме в цитоскелете над силами, передаваемыми в ходе механотрансдукции, может быть естественным фактором, защищающим клетку от подобного рода повреждений. Таким образом, увеличение экспрессии шаперонов при действии сдвиговой деформации, таких, как GRP78, по нашему мнению, носит цитопротективный характер и может играть важную роль в долгосрочной адаптации эндотелиальных клеток.

Модели для изучения сдвиговой деформации *in vitro*. Микрофлюидика

Необходимо отметить, что успехи в изучении механотрансдукции в эндотелии были бы невозможны без разработки эффективных клеточных моделей. Для исследования сдвиговой деформации активно применялся и был довольно успешен ряд устройств, например, конический вискозиметр и устройство с параллельными пластинами, которые значительно расширили наши представления о действии сдвиговой

деформации на клетки и позволили установить причины, определяющие анатомическую локализацию сосудистых заболеваний [44].

Сравнительно недавний прогресс в области микрофлюидики предоставил исследователям новые возможности. Микрофлюидные устройства обладают преимуществом по сравнению с традиционными системами в связи с тем, что в соответствии с законом Пуазейля сдвиговая деформация обратно пропорциональна кубу радиуса сечения круглого канала и прямо пропорциональна объемной скорости, поэтому в микромасштабе возможно достижение больших величин сдвиговой деформации при сравнительно низких волюметрических значениях. Так, при уменьшении радиуса канала устройства для моделирования СД в 10 раз, объемная скорость может быть уменьшена в 1000 раз с сохранением той же величины СД.

Для сосудистой системы характерен сравнительно широкий диапазон величин сдвиговой деформации: средняя величина в артериолах и капиллярах составляет 4—6 Па, но в более крупных артериях и венах она ниже и находится в диапазоне 1—2 Па. Тем не менее, в короткие периоды времени во время систолы сдвиговая деформация в артериях может достигать 20 Па. Минимизация объемной скорости имеет существенное значение для долгосрочных экспериментов. Нами разработана микрофлюидная система [45], в которой сдвиговая деформация 4 Па может поддерживаться длительное время — сутки и более — что важно для сравнительно продолжительного процесса адаптации эндотелиоцитов к сдвиговой деформации. Снижение объемных скоростей приводит к существенному сокращению количества требуемых реагентов, что удешевляет долгосрочные эксперименты. Нами применена в разработанной системе схема возврата рабочей жидкости (ростовой среды), что дает возможность использования почти не ограниченного по времени воздействия на эндотелиальные клетки СД в широком диапазоне, включая сверхвысокие значения.

К преимуществам микрофлюидных устройств относится также возможность и сравнительная легкость одновременного исследования нескольких средних значений сдвиговой деформации, например, в работе [46] исследовался диапазон 0,07—13 Па с использованием параллельных камер. В другом исследовании при использовании градиента сдвиговой деформации было показано, что индуцированная фактором некроза опухоли альфа (TNF α) экспрессия молекул адгезии VCAM-1 и E-selectin эндотелием сохраняется повышенной при низких значениях сдвиговой деформации (0,2—0,4 Па) и снижается при значениях СД более 0,8 Па [47]. Авторами показана более интенсивная адгезия моноцитов к областям с более низкой сдвиговой деформацией.

В литературе обсуждается довольно много подходов по биомоделированию микрососудов *in vitro*. Работы по поддержанию гистотипической культуры клеток *in vitro* начались сравнительно давно [48] и, фактически, с тех пор свойство эндотелиальных клеток самоорганизовываться в 2D культуре и в 3D матриксах активно используется в различных приложениях. Однако, биология эндотелиальных клеток зависит от взаимодействия с потоком, поэтому, актуальной задачей для более адекватного моделирования сосудов стала разработка методов перфузии капиллярно-подобных эндотелиальных структур *in vitro*.

Перфузия начала активно применяться уже в ранних работах, среди которых следует упомянуть интересное биомоделирование сосуда на основе полимеризованного в цилиндрической форме с добавлением гладкомышечных клеток коллагена, дополнительно укрепленного полимерной сеткой (полиэстер, Dacron) и засеянного эндотелиальными клетками бычьей аорты [49]. Эта модель была одним из первых успешных приближений мышечной артерии *in vitro*, в которой эндотелий сохранял свои функциональные свойства — синтезировал фактор Виллебранда, простаглицлин, формировал барьер проницаемости для крупных молекул, таких, как альбумин. В отсутствие полимерной сетки даже небольшие давления (менее 10 мм рт. ст.) приводили к разрыву сосуда, однако, с добавлением сетки, слоев коллагена и увеличением его концентрации удавалось достичь физиологических величин давления. Следует отметить, что создание такой модели весьма трудоемко и времязатратно (несколько недель), кроме того, имитации ветвления сосуда с помощью такого подхода сложно реализовать.

Для решения задачи создания перфузируемого микрососуда весьма эффективным является подход мягкой литографии, который сравнительно легко позволяет получить множественные полимерные реплики с твердой подложки с нанесенными на нее предварительно спроектированными структурами — полостями, каналами — и впоследствии подключить связанные пространства внутри чипа к жидкостным насосам различного принципа действия (шприцевые, перистальтические и др.). Интересным применением мягкой литографии является работа [50], в которой в силиконовый квадратный канал реплики сначала помещали иглу (диаметр 120 мкм, длина 15 мм), покрытую альбумином, и затем вводили раствор коллагена (коллаген тип I), который полимеризовался. После этого иглу удаляли, что формировало круглый в сечении канал в коллагеновом геле. Далее канал заполняли суспензией клеток HUVEC (10 млн/мл), плотность которой была увеличена за счет добавления декстрана 70 кДа до конечной концентрации 4%, что позволяло лучше контролировать посадочную плотность клеток. Таким об-

разом, формировался слой эндотелиальных клеток. Неадгезировавшие клетки удаляли путем включения тока среды со скоростью 3 мкл/мин через 5 мин после посадки клеток. Авторы использовали клеточные плотности, формировавшие не более 50% конфлюентности, так как в противном случае наблюдалась деформация коллагена и инвазия эндотелиальных клеток. Такое моделирование позволяло проводить прижизненные микроскопические наблюдения и оценку функциональных свойств эндотелия, включая его проницаемость. Авторы сообщают, что несмотря на отличия их системы с микрососудами *in vivo*, полученные «эндотелиальные конструкции» достаточно хорошо воспроизводят ряд функций и гидродинамические условия, характерные для больших венул. Конечный диаметр моделированных сосудов составлял 75—150 мкм. Авторы применяли величину сдвиговой деформации, характерную для венул и находившуюся в диапазоне 10—40 дин/см², т.е. 1—4 Па на основе расчетных значений, исходя из величины объемной скорости. Считается, что эндотелиальные трубки подобного диаметра могут выступать в качестве модели так называемых «гигантских» капилляров, которые наблюдаются в опухолях или очагах хронического воспаления.

Заключение

На настоящий момент накоплено значительное количество данных о механизмах механотрансдукции в эндотелии. Однако наше понимание этих процессов все еще остается неполным. Благодаря стремительно развивающимся биомедицинским технологиям, таким, как микрофлюидика, функциональная геномика, в ближайшее время следует ожидать дальнейшего и существенного роста наших знаний о функционировании эндотелия при действии механических сил.

References

- Chien S (2007) Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 292: H1209-H1224.
- Hahn C, Schwartz MA (2009) Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 10: 53-62.
- Davies PF, Civelek M, Fang Y, Fleming I (2013) The atherosusceptible endothelium: endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions in vivo. *Cardiovascular research*: cvt101.
- Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD (2009) Environmental sensing through focal adhesions. *Nature reviews Molecular cell biology*. 10: 21.
- Davies PF (1995) Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiological reviews*, 75: 519-60.
- Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER (2007) The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng*, 9: 121-67.
- Vink H, Duling BR (1996) Identification of Distinct Luminal Domains for Macromolecules, Erythrocytes, and Leukocytes Within Mammalian Capillaries. *Circulation Research*. 79: 581-9. Available: <http://circres.ahajournals.org/content/79/3/581>.
- Feng J, Weinbaum S (2000) Lubrication theory in highly compressible porous media: the mechanics of skiing, from red cells to humans. *Journal of Fluid Mechanics*. 422: 281-317.
- Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, et al. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annual review of biochemistry*. 68: 729-77.
- Liebersbach BF, Sanderson RD (1994) Expression of syndecan-1 inhibits cell invasion into type I collagen. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 20013-9.
- Squire JM, Chew M, Nneji G, Neal C, Barry J, et al. (2001) Quasi-periodic substructure in the microvessel endothelial glycocalyx: a possible explanation for molecular filtering? *Journal of structural biology*. 136: 239-55.
- Thi MM, Tarbell JM, Weinbaum S, Spray DC (2004) The role of the glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: a «bumper-car» model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101: 16483-8.
- Zeng Y, Tarbell JM (2014) The adaptive remodeling of endothelial glycocalyx in response to fluid shear stress. *PloS one*. 9: e86249.
- Tzima E, Del Pozo MA, Shattil SJ, Chien S, Schwartz MA (2001) Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment. *The EMBO journal*. 20: 4639-47.
- Ren X-D, Kiosses WB, Schwartz MA (1999) Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *The EMBO journal*. 18: 578-85.
- Davies PF, Robotewskyj A, Griem ML (1994) Quantitative studies of endothelial cell adhesion. Directional remodeling of focal adhesion sites in response to flow forces. *Journal of Clinical Investigation*. 93: 2031.
- Katsumi A, Orr AW, Tzima E, Schwartz MA (2004) Integrins in mechanotransduction. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 12001-4.
- Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera AM, Ramko EB, Davidson MW, et al. (2010) Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*. 468: 580-84.
- Li Y-SJ, Haga JH, Chien S (2005) Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *Journal of biomechanics*. 38: 1949-71.
- Wang Y, Miao H, Li S, Chen K-D, Li Y-S, et al. (2002) Interplay between integrins and FLK-1 in shear stress-induced signaling. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 283: C1540-C7.
- Del Rio A, Perez-Jimenez R, Liu R, Roca-Cusachs P, Fernandez JM, et al. (2009) Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science*. 323: 638-41.
- Liu Z, Tan JL, Cohen DM, Yang MT, Sniadecki NJ, et al. (2010) Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107: 9944-9.
- Gulino-Debrac D (2013) Mechanotransduction at the basis of endothelial barrier function. *Tissue barriers*. 1: e24180.
- Woodfin A, Voisin M-B, Nourshargh S (2007) PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 27: 2514-2523.
- Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, et al. (2005) A mechanosensory complex that

mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*.437: 426-431.

26. Fleming I, Fisslthaler B, Dixit M, Busse R (2005) Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *Journal of cell science*. 118: 4103-11.

27. Conway DE, Breckenridge MT, Hinde E, Gratton E, Chen CS, et al. (2013) Fluid shear stress on endothelial cells modulates mechanical tension across VE-cadherin and PECAM-1. *Current Biology*. 23: 1024-30.

28. Hur SS, Del Alamo JC, Park JS, Li Y-S, Nguyen HA, et al. (2012) Roles of cell confluency and fluid shear in 3-dimensional intracellular forces in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109: 11110-5.

29. Gerhold KA, Schwartz MA (2016) Ion Channels in Endothelial Responses to Fluid Shear Stress. *Physiology*. 31: 359-69.

30. Griffith TM (2004) Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? *British journal of pharmacology*. 141: 881-903.

31. Hoger JH, Ilyin VI, Forsyth S, Hoger A (2002) Shear stress regulates the endothelial Kir2. 1 ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99: 7780-5.

32. Wu J, Lewis AH, Grandl J (2017) Touch, Tension, and Transduction-The Function and Regulation of Piezo Ion Channels. *Trends in biochemical sciences*. 42: 57-71.

33. Garcia-Cardena G, Comander J, Anderson KR, Blackman BR, Gimbrone MA (2001) Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98: 4478-85.

34. Liu C, Bhattacharjee G, Boisvert W, Dilley R, Edgington T (2003) In vivo interrogation of the molecular display of atherosclerotic lesion surfaces. *The American journal of pathology*. 163: 1859-71.

35. Zhou J, Werstuck GH, Lhotak/vSarka, de Koning AL, Sood SK, et al. (2004) Association of multiple cellular stress pathways with accelerated atherosclerosis in hyperhomocysteinemic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 110: 207-13.

36. Bhattacharjee G, Ahamed J, Pedersen B, El-Sheikh A, Mackman N, et al. (2005) Regulation of tissue factor-mediated initiation of the coagulation cascade by cell surface grp78. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 25: 1737-43.

37. Zhou J, Lhotak/vSarka, Hilditch BA, Austin RC (2005) Activation of the unfolded protein response occurs at all stages of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 111: 1814-21.

38. Feaver RE, Hastings NE, Pryor A, Blackman BR (2008) GRP78 upregulation by atheroprone shear stress via p38-, α - β -dependent mechanism in endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 28: 1534-41.

39. Rigg RA, Healy LD, Nowak MS, Mallet J, Thierheimer ML, et al. (2016) Heat shock protein 70 regulates platelet integrin activation, granule secretion and aggregation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 310: C568-C75.

40. Mitrea DM, Kriwacki RW (2013) Regulated unfolding of proteins in signaling. *FEBS letters*. 587: 1081-8.

41. Vogel V (2006) Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 35: 459-88.

42. Bao G, Kamm RD, Thomas W, Hwang W, Fletcher DA, et al. (2010) Molecular biomechanics: the molecular basis of how forces regulate cellular function. *Cellular and Molecular Bioengineering*. 3: 91-105.

43. Ignashkova T, Mesitov M, Rybakov A, Moskovtsev A, Sokolovskaia A, et al. Deposition of von Willebrand factor in human endothelial cells HUVEC in the endoplasmic reticulum stress induced by an excess of homocysteine in vitro. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2012; 3: 81-6. (in Russian)

44. Chiu J-J, Chien S (2011) Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiological reviews*. 91: 327-87.

45. Kolesov D, Moskovtsev A, Mylnikova AN, Savina G, Sokolovskaya A, et al. (2016) Biomodeling of microvessels in a microfluidic chip. *Pathogenesis*. 14: 4-8.

46. Chau L, Doran M, Cooper-White J (2009) A novel multishear microdevice for studying cell mechanics. *Lab on a Chip*. 9: 1897-902.

47. Tsou JK, Gower RM, Ting HJ, Schaff UY, Inzana MF, et al. (2008) Spatial regulation of inflammation by human aortic endothelial cells in a linear gradient of shear stress. *Microcirculation*. 15: 311-23.

48. Folkman J, Haudenschild CC, Zetter BR (1979) Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76: 5217-21.

49. Weinberg CB, Bell E (1986) A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*. 231: 397-400.

50. Chrobak KM, Potter DR, Tien J (2006) Formation of perfused, functional microvascular tubes in vitro. *Microvascular research*. 71: 185-96.

Сведения об авторах:

Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, вед. науч.сотр. ФГБНУ НИИОПП, доцент каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, e-mail: bioinf@mail.ru

Колесов Дмитрий Валерьевич, науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, e-mail: maedros@bk.ru

Мильникова Алёна Николаевна, аспирантка РХТУ им. Д.И. Менделеева

Зайченко Данила Михайлович, мл.науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, e-mail: danilamihailovich@mail.ru

Соколовская Алиса Анатольевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ «НИИОПП»

Кубатиев Аслан Амирханович, доктор мед. наук, академик РАН, руководитель отдела молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП зав. каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

© Гомазков О.А., 2017
УДК 616-092

Гомазков О.А.

Нейрогенез в зрелом мозге человека. Обоснование терапевтического подхода

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, г. Москва, Россия, ул. Погодинская, д. 10

Нейроны взрослого мозга, формирующиеся в процессе нейрогенеза, являются неперенными участниками важных физиологических процессов. Новые клетки играют важную роль в поддержке когнитивных функций, обучения и памяти. Эндогенная активация нейральных прогениторных клеток отмечена в ответ на патологические изменения — ишемия, нейродегенеративные заболевания, физическая травма, психические расстройства. Однако на фоне большого числа исследований, выполняемых в эксперименте, понимание роли новых клеток в мозге человека остается предметом больших сомнений. Задача данной статьи — проанализировав информацию о нейрогенезе в мозге ЧЕЛОВЕКА, обозначить звенья эндогенной регуляции и обрисовать возможные «мишени» репаративной терапии.

Ключевые слова: нейрогенез зрелого мозга; гиппокамп; новые нейроны в мозге человека; мишени репаративной терапии.

Для цитирования: Гомазков О.А. Нейрогенез в зрелом мозге человека. Обоснование терапевтического подхода. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 126—135.
DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8532

Для корреспонденции: Гомазков Олег Александрович, проф., доктор биол. наук, гл. науч. сотр. Научно-исследовательского института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; e-mail: oleg-gomazkov@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013—2020 годы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.05.2017

Gomazkov O.A.

Neurogenesis in adult human brain. Substantiation of a therapeutic approach

Laboratory for Structure-Function Based Drug Design, Institute of Biomedical Chemistry. Pogodinskaya Str. 10, Moscow 119121, Russia

Neurons of the adult brain formed in the course of neurogenesis are indispensable participants of important physiological processes. New cells play an important role in supporting cognitive functions, learning and memory. Endogenous activation of neural progenitor cells has been noted to respond to pathological changes, such as ischemia, neurodegenerative diseases, physical trauma, and mental disorders. However, despite a large number of experimental studies, understanding of the role of new cells in human brain remains a matter of great doubt. This review focuses on analyzing information about neurogenesis in the human brain, identifying steps of endogenous regulation, and outlining possible «targets» of reparative therapy.

Keywords: neurogenesis in adult brain; hippocampus; neurons in human brain; targets of reparative therapy.

For citation: Gomazkov O.A. Neurogenesis in adult human brain. Substantiation of a therapeutic approach. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2017; 61(4): 126—135. (in Russian). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8532

For correspondence: Gomazkov O.A., Professor. Doctor of Biological Sciences, Principal Researcher, Institute of Biomedical Chemistry. Laboratory for Structure-Function Based Drug Design. Pogodinskaya Str., 10, Moscow, 119121, Russia; e-mail: oleg-gomazkov@yandex.ru

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

Financing. The work was carried out within the framework of the Program of Fundamental Scientific Research of the State Academies of Sciences for 2013—2020.

Received 15.05.2017

Введение

На протяжении большей части XX века в качестве центральной догмы нейробиологии господствовало положение, высказанное С. Рамоном Кахалем, что формирование новых нейронов, происходит только в период эмбрионального развития [1]. Это утверждение предполагало статичность сформировавшихся структур мозга и неспособность к какой-либо регенерации. В последующем, несмотря на отдельные попытки, отметались «еретические» устремления представить доказательства эндогенной трансформации нейральных стволовых клеток (НСК) в зрелом мозге. Эта история была описана как «центральная догма нейрологии» [2]. Нынешний период, благодаря новым методам экспериментальных и клинических исследований, характеризуется большим числом публикаций, описывающих трансформацию НСК, регуляцию нейрогенеза и роль новых нейронов в зрелом мозге. В 60-х годах появляются первые статьи о нейрогенезе в зрелом мозге, к 1996 году, согласно информации из базы данных PubMed, публикуется около 30 статей в год, а ещё через 10 лет эта цифра возрастает в 6 раз. К 2016 году общее число публикаций по запросу «neurogenesis — aging brain» достигает 7000. В большинстве случаев эти статьи приводят результаты экспериментальных исследований, однако количество работ, посвященных нейрогенезу в мозге человека, составляет ныне около одной трети.

Одной из ведущих тенденций в исследовании новых клеток на протяжении всей истории нейрогенеза являлось стремление согласовать его фактологию с терапевтическим применением. В первую очередь, эта тенденция обосновывается экспериментальными исследованиями, где была установлена экспрессия нейрогенеза при многих заболеваниях мозга, и, где мысль о репаративной роли новых нейронов оказывается доминантной. Идея казалась вполне доказательной на фоне работ, выполняемых на моделях нейральной патологии, однако её проецирование на клинический уровень встречало затруднения. Разочарование всегда имеет теневой отголосок и в минувшее десятилетие среди работ по «экспериментальному нейрогенезу» появились сомнения в сущности этого нейробиологического феномена [3]. Таким образом, утверждение роли новых клеток в мозге человека остается в большом отрыве от разнообразных данных, представленных в экспериментальных и обзорных работах.

Цель обзора — анализ информации о нейрогенезе зрелого мозга ЧЕЛОВЕКА, обсуждение звеньев эндогенной регуляции и возможных «мишеней» терапевтического вмешательства.

1. Общие принципы нейрогенеза в зрелом мозге

Нейрогенез зрелого мозга понимается как многоступенчатый регулируемый процесс, который включает ряд промежуточных стадий. Вновь образующиеся клетки происходят из резидентных стволовых структур, полипотентных клеток, которые проходят стадии активации стволовых предшественников (прогениторных клеток), их пролиферации, апоптотической селекции, преобразования в клетки определенного фенотипа, интеграции в нейрональную сеть. В результате таких трансформаций формируются зрелые нейроны, астроциты и олигодендроциты. Одно из традиционных представлений связывает эти процессы с основными герминативными нишами: субгранулярной зоной зубчатой извилины гиппокампа и субвентрикулярной областью боковых желудочков мозга. Из вентральной ниши новые клетки следуют по ростральному миграционному пути в обонятельную луковицу, интегрируясь в сеть интернейронов.

Данные многих работ подтвердили, что новообразованные клетки являются участниками важных физиологических процессов. Новые нейроны играют роль в процессах обучения и памяти, когнитивной функции, социальной адаптации. Активация НСК отмечена в ответ на патологические изменения (ишемия, нейродегенеративные заболевания, физическая травма, психические расстройства).

Выявляются «критические периоды» трансформации НСК, включающие выживание или гибель пролиферирующих клеток (селекция нейробластов), формирование структур определенного фенотипа, интеграция зрелых новых клеток в нейрональную сеть [4]. Это обстоятельство предопределяет лабильную сущность трансформирующихся структур и возможности их программирования в рамках определенного фенотипа.

Положение о том, что НСК трансформируются в нейральные элементы, которые интегрируются в регионы зрелого мозга, заменяя утраченные нейроны или глиальные клетки, открыло пути для новых теоретических воззрений в нейробиологии и новых терапевтических подходов. Определены понятия «адаптивного» и «репаративного» нейрогенеза, когда с позиций современной нейробиологии утверждается новая стратегия терапии заболеваний [5, 6].

2. Методические подходы в исследовании нейрогенеза зрелого мозга

В процессе нейрогенеза активированные прогениторные клетки мозга трансформируются во всё более совершенные промежуточные подтипы. Для каждого из них характерен набор молекулярных маркеров, которые используются для идентификации этих структур. В истории исследования нейрогенеза методиче-

ский прорыв связан с внедрением гистологической метки ДНК, аналога тимидина (5-бром-3'-деоксиуридин, BrdU), фиксирующей S-фазу митоза и пролиферацию нервных клеток. Число таких меток-маркеров постоянно увеличивалось, что позволило установить последовательность и скорость формирования клеток. Комбинации маркеров в сочетании с «репортерными» трансгенами (Nestin-GFP, Nestin-CFP_{nuc}, Nestin) позволило точно определять нейрогенные области мозга. Разработан подход для количественной оценки трансформации НСК, когда, комбинируя мультиизотопную спектрометрию с маркировкой нестин-зависимых линий, можно было связывать прогениторные клетки с особыми флуоресцентными белками [7].

Тем не менее, сопоставление результатов цитомикроскопии с данными, получаемыми на животных, нуждается в подтверждении специфичности нейрогенеза в мозге человека. Расхождения в достоверности и возможностях трактовки результатов, получаемых на животных и у человека, представляются принципиальными [8]. Методический нюанс заключается в том, что исследования на животных позволяют отслеживать динамику этапов нейрогенеза, решать экспериментальные задачи с помощью генетических и фармакологических вариаций, использовать модели нейродегенеративной патологии. Клинические исследования, работа с аутопсийным материалом, как правило, фиксируют явление постфактум, и, кроме того, ограничены этическими и организационными проблемами. Исследования на человеке, обсуждаемые в данной статье, включают значительный материал, подтверждающий основные закономерности нейрогенеза, установленные в экспериментах.

Применение магнитной резонансной томографии (МРТ) и позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ) в сочетании с радиоактивной тимидиновой меткой (3'-deoxy-3'-[(18)F]fluoro-L-thymidine) открывает возможности неинвазивного исследования нейрогенеза [9]. При использовании в качестве маркеров моноклональных антител, конъюгированных с наночастицами окиси железа, были получены новые данные о трансформации и миграции субпопуляций НСК в мозге [10]. На модели ишемического инсульта (окклюзия церебральной артерии у мышей) применена технология прижизненного мониторинга с внутрижелудочковым введением наночастиц оксида железа (anti-CD15-SPION's). Через 7 сут. после инсульта выявлялся усиленный сигнал в субвентрикулярной зоне и обонятельном тракте, который свидетельствовал об активации НСК. Данные МРТ были подтверждены гистологическим контролем [11].

Новым шагом в развитии клеточной технологии и изучения нейрогенеза оказалась разработка трехмер-

ной (3D) клеточной платформы с анализом количества и состояния трансформирующихся НСК человека. Этот подход позволил исследовать молекулярные механизмы патогенеза, в частности, формирование бета-амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков при болезни Альцгеймера. С другой позиции, 3D клеточная платформа может быть использована для отбора соединений, способных влиять на трансформацию НСК человека и оценку их токсичности [12—14].

3. Трансформация прогениторных клеток в мозге человека. Доказательства и сомнения.

Исследования, выполненные *in situ* на постморальном материале, впервые продемонстрировали формирование новых нейронов в зоне зубчатой извилины гиппокампа человека [15]. Наличие функциональных НСК подтверждено на материале хирургической биопсии, когда на культуре гиппокампальных НСК, были продемонстрированы пролиферация и дифференциация клеток-предшественников [16].

При изучении материалов мозга пациентов возраста от 21 до 103 лет сделано заключение, что число маркеров нейрогенеза уменьшается с возрастом, тогда как уровень астроцитов и микроглии увеличивается в течение взрослой жизни. Снижение с возрастом пролиферации НСК и числа зрелых нейронов коррелирует с уменьшением активности трофических ростовых факторов, важных регуляторов трансформации клеток [17]. Описаны НСК, полученные из ольфакторной луковицы при операциях на человеке. При выращивании этих клеток в культуре в присутствии трофических факторов они дифференцировались в нейроны дофаминергического фенотипа [18].

Сравнение этапов трансформации прогениторных клеток и формирования нейронов у животных (модели патологии) и у человека (аутопсийный материал) дает вполне совпадающие картины нейрогенеза (таблица).

Однако следует отметить, что такие факторы, как причина смерти, характер и продолжительность заболевания, время получения клинического материала и др. могут существенно исказить интерпретацию результатов при исследовании нейрогенеза. Эти соображения послужили поводом для сомнений. Dennis et al., проанализировав особенности нейрогенеза у людей различного возраста, пришли к заключению, что, если формирование новых клеток в зрелом мозге имеет место, то число их исключительно мало и функционально незначимо. Поэтому сравнение с «классическими» работами по нейрогенезу на грызунах оказывается будто бы абсолютно некорректным [19]. Однако в качестве контраргумента следует обратить внимание на разночтения методического

характера: специфичность используемых маркеров, тип образующихся новых клеток, зоны их формирования [20].

Предпринимаются попытки использования неинвазивных методов нейровизуализации — МРТ и ПЭТ — для изучения нейрогенеза в клинических условиях. Гистологические маркеры, используемые в работе с аутопсийным материалом человека, соответствуют приемам цитологического анализа на животных. Взаимодополняющие методические подходы позволяют представить более полную и достоверную информацию в работе с экспериментальным и клиническим материалом.

4. Нейропатология и формирование новых нейронов

Присутствие нейральных стволовых клеток в мозге и их трансформация были констатированы на клиническом материале при старении, ишемической патологии, нейродегенеративных и психических заболеваниях.

Исследование клинического материала пациентов с травмой спинного мозга выявило увеличенное число

нестин-позитивных клеток (как свидетелей нейрональных предшественников) и клеток муссаши 1 (как маркеров нейробластов). Установлена положительная корреляция между числом прогениторных клеток и положительными клиническими показателями после травмы [21].

Исследование аутопсийного материала мозга пациентов, после ишемического инсульта, выявило новые клетки в зоне ишемической пенумбры, окружающей кортикальное поражение [22, 23]. На более поздних стадиях заболевания в зоне, пограничной инфаркту, выявлено большое число иммунопозитивных меток эндотелиального ростового фактора (VEGF) и новых кровеносных микрососудов, что свидетельствовало о сопряженной стимуляции васкуло- и нейрогенеза [24].

Для болезни Альцгеймера (БА) характерен ряд патохимических признаков, отражающих дезорганизацию нейронов. Последовательно связанные негативные процессы ведут к образованию токсичных бета-амилоидов, отложению бляшек и образованию нейрофибриллярных сплетений. Экспериментальные

Таблица

Изменения нейрогенеза при заболеваниях различной этиологии у животных и человека

Патология	Зона мозга	Животные	Человек
Ишемия мозга. Инсульт	Субвентрикулярная зона	Стимуляция нейрогенеза; активная пролиферация. Химическая блокада увеличивает зону поражения.	Повышенная пролиферация НСК, увеличение числа нейробластов.
	Гиппокамп	Эндогенная стимуляция нейрогенеза; активная пролиферация.	Атипичная дифференцировка нейробластов
	Кора мозга Полосатое тело	Стимуляция нейрогенеза Усиленная пролиферация НСК. Миграция клеток в зону поражения	Активная пролиферация; миграция клеток в зону поражения. Концентрация новых нейронов в зоне пенумбры.
Болезнь Альцгеймера	Субвентрикулярная зона и гиппокамп	Увеличение числа маркеров нейрогенеза до формирования бета-амилоидов.	Пролиферация в субвентрикулярной зоне. Появление новых нейронов в гиппокампе.
Болезнь Паркинсона	Субвентрикулярная зона	Сниженная пролиферация; депрессия нейрогенеза в ольфакторной зоне	Снижение пролиферации.
	Гиппокамп	Сниженная пролиферация	Уменьшение числа прогениторных клеток
	Черная субстанция	Стимуляция нейрогенеза	Сниженная пролиферация пронеуронов
Болезнь Геттингтона	Субвентрикулярная зона	Неизменная или увеличенная пролиферация НСК и миграция в стриатум	Увеличенная пролиферация; увеличение числа НСК и нейробластов.
Депрессия	Гиппокамп	Антидепрессанты стимулируют нейрогенез	Увеличение числа НСК при лечении антидепрессантами
Старение	Гиппокамп	Снижение числа пролиферирующих клеток. Антидепрессанты не стимулируют нейрогенез.	Уменьшение объема гиппокампа.
Примечание. Показаны результаты экспериментальных исследований на животных (модель патологии) и данные аутопсийного материала у пациентов			

исследования показывают, как метаболиты амилоидного пептида-предшественника могут влиять на ход нейрогенеза — стимулируя или, напротив, блокируя отдельные этапы. В аутопсийном материале БА выявлена экспрессия белков-маркеров, которая указывала на появление новых нейронов. Экспрессия этих клеток ассоциировалась с субгранулярной (нейропролиферативной) областью гиппокампа [25]. Существенно, что анализ временных параметров свидетельствует об активации нейрогенеза на ранних стадиях заболевания, еще до формирования амилоидных депозитов и гибели зрелых нейронов. Эти наблюдения позволили заключить, что нейрогенез оказывается предваряющей частью процессов, сигнализирующих о молекулярном дисбалансе при болезни Альцгеймера [26].

Заслуживают внимания исследования *клинического материала* при БА с подробной характеристикой маркеров нейрогенеза и динамики заболевания. Установлены изменения пролиферации НСК и формирования нейроblastов в субгранулярной области гиппокампа и в субвентрикулярной зоне. Изменения активности холинэстеразы, фермента, участвующего в деградации ацетилхолина, коррелировали с фазами заболевания. Следовал вывод, что нейрогенез при БА сопровождается увеличенной пролиферацией прогениторных клеток, однако без выраженного увеличения числа мигрирующих нейроblastов и их дифференцировки в зрелые нейроны. Инверсии нейрогенеза, выявляемые в этих исследованиях, соответствуют различным фазам заболевания и зонам трансформации клеток мозга [27].

Болезнь Паркинсона обусловлена прогрессирующей дегенерацией дофаминовых нейронов черной субстанции мозга, вследствие чего развивается дисфункция моторной системы. Анализ генов, причастных к болезни Паркинсона, демонстрировал связь с пролиферацией и выживанием НСК. На клиническом материале установлено значительное уменьшение пролиферирующих нейроblastов, которое ассоциировалось с дегенерацией нигральных дофаминергических нейронов [28]. Следовало предположение, что дебют данного заболевания связан с изначальной дисрегуляцией нейрогенеза [29]. Приведенные выше эксперименты показали, что клетки, полученные из ольфакторной луковицы человека, обладали мультипотентной активностью и при экспрессии нейротрофинами трансформировались в нейроны дофаминергического типа [18]. Как логическое следствие можно заключить, что сниженный нейрогенез при болезни Паркинсона сопряжен с ограниченной секрецией нейротрофиновых полипептидов EGF и CNTF в субвентрикулярной области [30, 31].

5. Этюд о гиппокампе.

Психические расстройства и нейрогенез

Гиппокамп расценивается как «орган» эмоционального и когнитивного поведения и физиологических ответов на стрессорные воздействия. Как механизм реализации многих функций эта зона мозга служит мишенью для гормонов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Современная нейрофизиология постулирует, что гиппокамп является структурой, где происходит образование новых клеток. Зубчатая извилина предоставляет основную нишу для регулируемой трансформации НСК. С этих позиций ключевая роль новорожденных нейронов в гиппокампе может рассматриваться как особая форма нейрональной пластичности и, в частности, как интегратор стрессорных ответов и систем сенсорных реакций организма [32, 33].

Клинический анализ свидетельствует, что депрессии сопутствуют морфологические изменения некоторых регионов мозга, сопровождающие деструкцию нейронов и клеток глии. Отмечается уменьшение объема гиппокампа, плотности клеток в зубчатой извилине и в пирамидных нейронах [34]. Морфологическим изменениям в гиппокампе и в амигдале соответствуют, в качестве показателей нарушенной нейропластичности — замедление психомоторных реакций, дефицит контроля внимания, нарушения памяти [35]. На основании исследований постмортального материала пациентов с выраженным депрессивным расстройством было установлено, что снижение объема гиппокампа ассоциируется с меньшим количеством гранул нейронов в зубчатой извилине [36].

Связь нейрогенеза с депрессией впервые обоснована в 2000 г., когда экспериментально было установлено, что действие антидепрессантов совпадает со стимулированным нейрогенезом в гиппокампе [37]. Важной в этом контексте служит информация о роли серотонина в патогенезе тревожно-депрессивного расстройства, но также и в стимуляции нейрогенеза. Блокирование синтеза серотонина и разрушение серотонинергических нейронов снижали формирование новых клеток в субвентрикулярной области и в зубчатой извилине гиппокампа [38].

Экспериментальные исследования показали, что флуоксетин и имипрамин, а также ребоксетин и транлизипромин увеличивали пролиферацию клеток-предшественников в зубчатой извилине и хилусе мышей. Длительное применение оланзапина и галоперидола увеличивало формирование зрелых нейронов в префронтальной коре и стриатуме, а также стимулировало долговременную синаптическую потенцию, как показатель функционального восстановления [39]. В опытах на обезьянах, которые подвергались электросудорожному воздействию, как формы

антидепрессантной терапии, отмечалась активная пролиферация НСК в субгранулярной зоне зубчатой извилины. Большинство таких предшественников дифференцировалось в нейроны, глиальные клетки или трансформировались в клетки эндотелия [40]. На аутопсийном материале пациентов с выраженным депрессивным расстройством также была подтверждена стимуляция нейрогенеза при терапии ингибиторами обратного захвата серотонина (сертралин, флуоксетин) и трициклическими антидепрессантами (кломипрамин, нортриптилин). Новые нейроны, выявляемые с помощью специфических маркеров, обнаруживались в передней части зубчатой извилины и ростральном пути переднего мозга [41].

Однако эксперименты, проводимые на модели страха/депрессии, показали, что эффект антидепрессантов нивелируется при нарушенном нейрогенезе. Поведенческие реакции у мышей с депрессией в ответ на применения флуоксетина оказывались атипичными при блокаде нейрогенеза, вызываемой X-радиационным облучением [42]. Аналогичные результаты были получены на нокаутных мышцах с нулевым уровнем 1A рецептора серотонина, получавших флуоксетин [43]. Сниженное число прогениторных клеток в зубчатой извилине, как показатель «угасающего» нейрогенеза, и ослабление реакции на антидепрессанты отмечалось также в клиническом материале возрастных пациентов [44].

Современная концепция нейрофизиологии утверждает, что при блокировании или возрастном снижении нейрогенеза нарушается когнитивный и эмоциональный контакт индивидуума с окружающим контекстом [45]. В этом анализе ключевым оказывается вывод, что при психическом расстройстве дезорганизация развивается первоначально на синаптическом уровне и затрагивает контроль постсинаптических белков. Компьютерный подход с использованием анализа *in silico* позволил заключить, что основной механизм инициации нейрогенеза антидепрессантами реализуется за счет стимуляции селективных Sigma1 и 5-HT1A рецепторов серотонина [46]. На базе этих представлений строится гипотеза о роли нейрогенеза в качестве корректора синаптической недостаточности при депрессивном расстройстве. Идея опиралась на так называемую моноаминергическую теорию заболевания [47]. Однако представляемая столь однопланово моноаминергическая теория входит в противоречие с тем фактом, что стимуляция нейрогенеза осуществляется антидепрессантами *различных классов*. В числе таковых, помимо селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (флуоксетин), оказались ингибиторы моноаминоксидазы (транилципромин), селективные ингибиторы обратного захвата норадреналина (ребоксетин), антагонисты рецепторов

NMDA (мемантин), трициклические антидепрессанты (имипрамин). Следовательно, логический посыл: *антидепрессант — коррекция нейромедиатора — трансформация прогениторных клеток — клинический эффект* — должен включать дополнительную причинную последовательность.

Следовало полагать, что эффект различных антидепрессантов реализуется за счет дополнительных эндогенных продуктов, влияющих на экспрессию нейрогенеза. Суммирован значительный экспериментальный материал, который указывает на то, что в патогенезе депрессивного расстройства участвуют также трансдукторные белки, регулируемые фактором CREB и нейротрофином BDNF [48]. Терапия флуоксетином и ребоксетином приводила к быстрому увеличению BDNF мРНК в гиппокампе и коре мозга, что свидетельствовало о раннем включении посттранскрипционных механизмов при этой терапии [49]. Таким образом, при депрессии нейротрансмиттерная дисфункция, развивающаяся первоначально на синаптическом уровне, компенсаторно включает систему постсинаптических трансдукторных и транскрипционных связей, реорганизуя нейрогенез и формирование новых структур. Помимо сложной «игры» нейромедиаторов и сигнальных белков, отмечается участие нуклеарного белка NF-kB, эпигенетических регуляторов микро-РНК, различных нейротрофинов и ростовых факторов. Однако, по большому счету, весь этот «регуляторный арсенал» имеет также отношение и к управлению нейрогенезом — к различным фазам трансформации клеток-предшественников и формированию новых клеток [50]. В обзорной статье с интригующим названием «*Adult neurogenesis, mental health, and mental illness: hope or hype?*» («*Нейрогенез взрослого мозга, психическое здоровье и психические заболевания: надежда или обман?*») в качестве ведущей идеи прослеживается роль новых нейронов при стрессорных воздействиях, посттравматической депрессии, психических расстройствах, связанных с болезнью Гентингтона и др. [51]. Ведущая роль принадлежит здесь гиппокампу, который рассматривается как «орган» с наличием специфических нейрохимических компонентов и специфических функций.

Следует особо отметить то обстоятельство, что особые зоны гиппокампа служат нишами для трансформации НСК и формирования нейронов и клеток глии. Можно полагать, что новые клетки участвуют в восстановлении функций гиппокампа при стрессе и других формах нейрональной дезорганизации. Также можно допустить, что новые структуры, формирующие нейроны определенного медиаторного фенотипа, усиливают нарушенную при депрессивном расстройстве работу синапсов и, соответственно, способствуют

межнейрональному взаимодействию. Следует подчеркнуть многообразие функциональной «потентности» НСК: речь идет не просто об увеличении количества новых нейронов: утверждается, что по мере трансформации прогениторные клетки могут выполнять секреторные функции, которые не учитывались в предыдущих концепциях [3].

Гипотетический взгляд на роль нейрогенеза в нивелировании депрессивных расстройств и поддержке терапии антидепрессантами представлен на рисунке.

6. Нейрогенез в мозге человека как «мишень» терапии

У людей отмечается значительное число генерируемых нейронов, по некоторым исчислениям вчетверо превышающее уровень нейрогенеза у грызунов. Прогрессирующий с возрастом нейрогенез у человека от ювенильного до зрелого возраста, по-видимому, коррелирует с когнитивным развитием организма. Однако в период старения как у людей, так и у животных интенсивность формирования новых нейронов резко идет на убыль.

По современным представлениям нейрогенез является одним из важнейших механизмов пластичности мозга, которая выражается в перестройке нейрональных связей, формировании и перекодировке синапсов как сети передачи информации, интранейрональной консолидации при адаптации к новым «вызовам». Увеличение пула новых клеток (нейронов, глиацитов, олигодендроцитов), рассматривается не только как структурное, но и функциональное «подспорье» мозга.

Стремление рассматривать новые клетки как исключительно «репаративный материал» выглядит

упрощенным. Анализ возможностей репаративного нейрогенеза подчас строится на ограниченной территории фактов. Идея репаративной предназначенности, доминировавшая в течение двух десятилетий, резюмирована иронически: «Терапевтический потенциал нейральных стволовых клеток — больше в воображении, чем истинно в мозге?» [52]. Современный подход исходит из положения, что при патологии НСК могут дифференцироваться в различные структурные формы (нейроны, астроциты, олигодендроциты), в зависимости от ситуации и «потребности», и таким образом интегрироваться в поврежденные ткани. За счет регулируемых изменений дифференцировки НСК могут поставлять в нарушенные ткани структурно и функционально обновленный материал. Идея программирования НСК в ходе их трансформации объясняет появление клеток, выполняющих адаптивную, организующую или репаративную миссию.

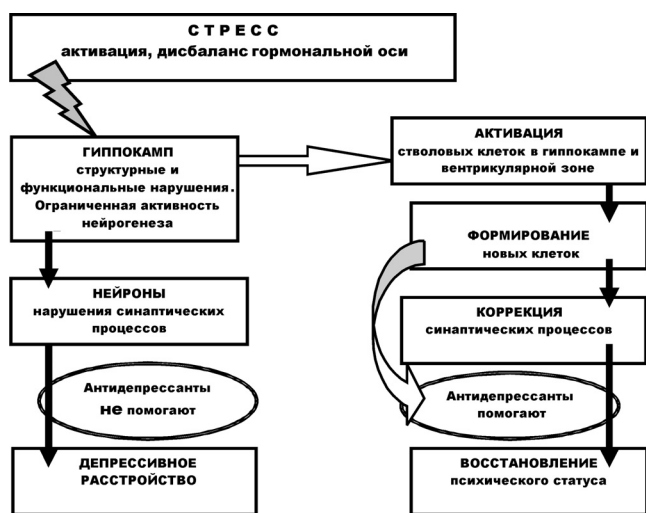
Из этих суждений следует несколько итоговых заключений.

1. Многочисленные данные, представляющие нейрогенез при исследовании на животных, могут служить подтверждением значимости новых клеток в мозге человека. Сравнение динамики нейрогенеза, изменений трансформаций НСК при патологии в мозге животных и человека показывает их принципиальное сходство. Важно отметить сходство молекулярных механизмов регуляции нейрогенеза, которая определяет функцию новых клеток при обучении, социальной адаптации и патологии [53].

2. Нейрогенез рассматривается как *системная мишень*, воздействием на которую можно корригировать патологические процессы в мозге, влияя на звенья молекулярного сигналинга: нейромедиаторов, трансдукторных, транскрипционных и эпигенетических факторов. Большое число убедительных исследований иллюстрирует возможности экспериментальной терапии за счет воздействия на определенные молекулярные мишени [54].

3. Такой подход очерчивает новую стратегию терапии заболеваний, включающих ишемические, нейродегенеративные и психические расстройства, а также поддержку возрастной категории пациентов. Возможности трансплантационной терапии с введением в мозг человека полипотентных или трансформирующихся стволовых клеток ограничены серьезными осложнениями.

Нейрогенез в зрелом мозге человека и изменения трансформации НСК можно стимулировать с помощью отдельных лекарственных препаратов, цитокинов, факторов роста, влияющих на клеточные мишени. С этих позиций также становится понятным терапевтическое действие уже известных антиоксидантов, малых пептидов, антидепрессантов и др., влияющих



Активация нейрогенеза способствует поддержанию нейротрансмиттерной функции синапсов мозга и ограничению депрессивного расстройства.

на стадии трансформации НСК. Скрининг, выполненный на клеточных тест-системах человека, позволил рассмотреть группы соединений, участвующие в стимулировании нейрогенеза *in vivo*. В этом списке — статины, блокаторы рецепторов трансформирующего фактора роста (TGF- β RI), ингибиторы гликоген синтазы киназы-3 (GSK-3) и др. Соединения каждого класса имели свои мишени: как селективные антагонисты рецепторов серотонина, антагонисты ингибитора трансдукторного белка ρ 38-МАРК, агонисты бета-адренорецепторов, статины — ингибиторы редуказы коэнзима А (HMG-CoA) и др. [55].

Многолетнее использование *растительных препаратов* в медицине находит новое толкование как средств стимуляции нейрогенеза для профилактики старения и нейродегенеративных заболеваний. В качестве механизма сопровождения нейрогенеза и нейропротекции отмечается экспрессия белков системы трансдукции PI3K/Akt [56, 57].

Новым аспектом является применение *электро- и магнитостимулирующих воздействий* на мозг с целью экспрессии НСК и образования новых нейронов. В исследованиях *in vivo* установлено, что воздействие низкочастотных электромагнитных полей стимулировало пролиферацию и нейрональную дифференцировку прогениторных клеток гиппокампа с последующей интеграцией в нейрональную сеть. Магнитная стимуляция не только увеличивала количество НСК на фоне стрессовых расстройств, но и способствовала дендритному ветвлению, усиливающему структуру нейрональной сети. Эти экспериментальные данные предоставляют новые возможности для объяснения механизма электро- и магнитостимулирующей терапии и применения в клинике [58].

Заключение

Определение роли новых клеток в мозге человека остается в большом отрыве от подробно исследованной феноменологии нейрогенеза в экспериментальных и обзорных работах [59]. Информацию о нейрогенезе в мозге человека можно суммировать в следующих позициях:

- Несмотря на методические трудности работы с постмортальным и аутопсийным материалом человека, полученные данные соответствуют закономерностям нейрогенеза в норме и при патологии, доказанным в экспериментальных исследованиях. Исследования *in situ* на базе 3D клеточной платформы культуры клеток, получаемых из мозга пациентов, дают дополнительную информацию. Этот подход может быть также применен для отбора фармакологических средств терапии на основе воздействия на трансформирующиеся прогениторные клетки.

- Особенности нейрогенеза в материале, полученном от больных с нейродегенеративными и ишемическими расстройствами, позволяют считать обоснованной основную задачу — возможность коррекции нейрогенеза в ишемизированном мозге человека за счет селективного влияния на определенные этапы трансформации прогениторных клеток. Однако следует признать, что имеющийся материал по нейрогенезу у человека ввиду его относительной немногочисленности может не отражать динамику патологического процесса. Поэтому на данном этапе следует вести речь о генерализованной коррекции нейрогенеза в условиях клинической патологии с «оглядкой» на изменения функционального состояния пациента.

- Рассмотрение веществ, способных влиять на нейрогенез, представляемых в немалом списке экспериментальных работ, позволяет оценить механизмы терапевтической активности уже используемых препаратов с учетом их роли в стимулировании новых клеток мозга.

- Одним из существенных направлений в терапевтической коррекции НСК служит идея ключевых «мишеней» нейросигналинга на уровне факторов трансдукторного, транскрипционного и эпигенетического контроля в мозге.

Понимание регулируемой трансформации НСК как одного из механизмов организации работы мозга служит основанием терапевтического воздействия на выбранные мишени для коррекции ишемических, нейродегенеративных и психических заболеваний человека.

References

1. Ramon y Cajal S. Identification and characterisation of neural progenitor cells in the adult mammalian brain. Berlin-Heidelberg; Springer, 1928.
2. Colucci-D'Amato L., Bonavita V., di Porzio U. The end of the central dogma of neurobiology: stem cells and neurogenesis in adult CNS. *Neurol. Sci.* 2006; 27(4): 266-70.
3. Gomazkov O.A. Why Does the Brain Needs New Nerve Cells? [Zashem vzrosloму mozgu novye nervnye kletki?] Moscow; IKAR, 2016. (in Russian)
4. Yamaguchi M., Mori K. Critical periods in adult neurogenesis and possible clinical utilization of new neurons. *Front Neurosci.* 2014; 8(2): 177-83.
5. Yarygin K.N., Yarygin V.N. Neurogenesis in the central nervous system and prospects of regenerative neurology. *Zhurnal Neyropatol. Psikhiatr. im. S.S. Korsakova.* 2012; 112(1): 4-13. (in Russian)
6. Gomazkov O.A. Transformation of neural stem cells and reparative processes in the brain. *Zhurnal Neyropatol. Psikhiatr. im. S.S. Korsakova.* 2014; 114(8): 4-12. (in Russian)
7. Enikolopov G., Guillermier C., Wang M., Trakimas L., Steinhauser M., Lechene C. Brain stem cell division and maintenance studied using multi-isotope imaging mass

- spectrometry (MIMS). *Surf. Interface Anal.* 2014; 46 (Suppl 1):140-3.
8. Sierra A., Encinas J.M., Maletic-Savatic M. Adult human neurogenesis: from microscopy to magnetic resonance imaging. *Front Neurosci.* 2011. doi: 10.3389/fnins.2011.00047.
9. Rueger M.A., Schroeter M. In vivo imaging of endogenous neural stem cells in the adult brain. *World J. Stem Cells.* 2015; 7(1): 75-83.
10. Zhong X.M., Zhang F, Yang M., Wen X.H., Zhang X., Duan X.H., Shen J. In Vivo Targeted Magnetic Resonance Imaging of Endogenous Neural Stem Cells in the Adult Rodent Brain. *Biomed. Res. Int.* 2015. doi: 10.1155/2015/131054.
11. Zhang F., Duan X., Lu L., Zhang X., Zhong X., Mao J., Chen M., Shen J. In Vivo Targeted MR Imaging of Endogenous Neural Stem Cells in Ischemic Stroke. *Molecules.* 2016. doi: 10.3390/molecules21091143.
12. Lee M.Y., Kumar R. A., Sukumaran S.M., Hogg M.G., Clark D.S., Dordick J.S. Three-dimensional cellular microarray for high-throughput toxicology assays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105(1): 59-63.
13. Meli L., Barbosa H.S.C., Hickey A.M., Gasimli L., Nierode G., Diogo M.M., et al. Stem Cell Research. 2014; 13(1): 36-47.
14. Nierode G.J., Perea B.C., McFarland S.K., Pascoal J.F., Clark D.S., Schaffer D.V., Dordick J.S. High-Throughput Toxicity and Phenotypic Screening of 3D Human Neural Progenitor Cell Cultures on a Microarray Chip Platform. *Stem Cell Reports.* 2016; 7(5): 970-82.
15. Eriksson P.S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T., Alborn A.M., Nordborg C., Peterson D.A., Gage F.H. Neurogenesis in the human hippocampus. *Nat. Med.* 1998; 4(11): 1313-7.
16. Kukekov V.G., Laywell E.D., Suslov O., Davies K., Scheffler B., Thomas L.B. et al. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp. Neurol.* 1999; 156(2): 333-44.
17. Weissleder C., Fung S.J., Wong M.W., Barry G., Double K.L., Halliday G.M. et al. Decline in Proliferation and Immature Neuron Markers in the Human Subependymal Zone during Aging: Relationship to EGF- and FGF-Related Transcripts. *Front Aging Neurosci.* 2016; 8; 274.
18. Alizadeh R., Hassanzadeh G., Joghataei M.T., Soleimani M., Moradi F., Mohammadpour S., et al. In vitro differentiation of neural stem cells derived from human olfactory bulb into dopaminergic-like neurons. *Eur. J. Neurosci.* 2016. doi:10.1111/ejn.13504.
19. Dennis C.V., Suh L.S., Rodriguez M.L., Kril J.J., Sutherland G.T. Human adult neurogenesis across the ages: An immunohistochemical study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2016; 42(7): 621-38.
20. Marucci G. Commentary on Human adult neurogenesis across the ages: An immunohistochemical study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2016. doi: 10.1111/nan.12377.
21. Cawsey T., Dufflou J., Weickert C.S., Gorrie C.A. Nestin-Positive Ependymal Cells Are Increased in the Human Spinal Cord after Traumatic Central Nervous System Injury. *J. Trauma.* 2015; 32(18): 1393-402.
22. Jin K., Wang X., Xie L., Mao X.O., Zhu W., Wang Y. et al. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006;103(35): 13198-202.
23. Nakayama D., Matsuyama T., Ishibashi-Ueda H., Nakagomi T., Kasahara Y., Hirose H. et al. Injury-induced neural stem/progenitor cells in post-stroke human cerebral cortex. *Eur. J. Neurosci.* 2010; 31(1): 90-8.
24. Minger S.L., Ekonomou A., Carta E.M., Chinoy A., Perry R.H., Ballard C.G. Endogenous neurogenesis in the human brain following cerebral infarction. *Regen Med.* 2007; 2(1): 69-74.
25. Jin K., Peel A.L., Mao X.O., Xie L., Cottrell B.A., Henshall D.C., Greenberg D.A. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(1): 343-7.
26. Mu Y., Gage F.H. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 2011; 6: 85. doi: 10.1186/1750-1326-6-85.
27. Perry E.K., Johnson M., Ekonomou A., Perry R.H., Ballard C., Attems J. Neurogenic abnormalities in Alzheimer's disease differ between stages of neurogenesis and are partly related to cholinergic pathology. *Neurobiol. Dis.* 2012; 47(2): 155-62.
28. Hoglinger G.U., Rizk P., Muriel M.P., Duyckaerts C., Oertel W.H., Caille I. et al. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat. Neurosci.* 2004; 7(7): 726-35.
29. Le Grand J.N., Gonzalez-Cano L., Pavlou M.A., Schwamborn J.C. Neural stem cells in Parkinson's disease: a role for neurogenesis defects in onset and progression. *Cell Mol. Life Sci.* 2015; 72(4): 773-97.
30. Yang P., Arnold S.A., Habas A., Hetman M., Hagg T. Ciliary Neurotrophic Factor Mediates Dopamine D2 Receptor-Induced CNS Neurogenesis in Adult Mice. *J. Neurosci.* 2008; 28(9): 2231-41.
31. O'Keefe G.C., Tyers P., Aarsland D., Dalley J.W., Barker R.A., Caldwell M.A. Dopamine-induced proliferation of adult neural precursor cells in the mammalian subventricular zone is mediated through EGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106: 8754-9.
32. Dranovsky A., Leonardo E.D. Is there a role for young hippocampal neurons in adaptation to stress? *Behav. Brain. Res.* 2012; 227(2): 371-5.
33. Drew L.J., Fusi S., Hen R. Adult neurogenesis in the mammalian hippocampus: why the dentate gyrus? *Learn Mem.* 2013; 20(12): 710-29.
34. Gusev E.I., Bogolepova A.N. The role of neuroplasticity in the development of depressive disorders. *Trudnyy patient.* 2010; 10: 3-7.
35. Campbell St., Marriott M., Nahmias C.I., MacQueen G.M. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am. J. Psychiatry.* 2004; 161(4): 598-607.
36. Boldrini M., Santiago A.N., Hen R., Dwork A.J., Rosoklija G.B., Tamir H. et al. Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression. *Neuropsychopharmacology.* 2013; 38(6): 1068-77.
37. Malberg J.E., Eisch A.J., Nestler E.J., Duman R.S. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 2000; 20(24): 9104-10.
38. Brezun J.M., Daszuta A. Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience.* 1999; 89(4): 999-1002.
39. Wang H.D., Dunnavant F.D., Jarman T., Deutch A.Y. Effects of antipsychotic drugs on neurogenesis in the forebrain of the adult rat. *Neuropsychopharmacology.* 2004; 29(7): 1230-8.
40. Perera T.D., Coplan J.D., Lisanby S.H., Lipira C.M., Arif M., Carpio C. et al. Antidepressant-Induced Neuroge-

nesis in the Hippocampus of Adult Nonhuman Primates. *J. Neurosci.* 2007; 27(18): 4894-901.

41. Boldrini M., Underwood M.D., Hen R., Rosoklija G.B., Dwork A.J., John Mann J., Arango V. Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. *Neuropsychopharmacology.* 2009; 34(11): 2376-89.

42. David D.J., Samuels B.A., Rainer Q., Wang J.W., Marsteller D., Mendez I. et al. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron.* 2009; 62(4): 479-93.

43. Santarelli L., Saxe M., Gross C., Surget A., Battaglia F., Dulawa S., et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science.* 2003; 301(5634): 805-9.

44. Lucassen P.J., Stumpel M.W., Wang Q., Aronica E. Decreased numbers of progenitor cells but no response to antidepressant drugs in the hippocampus of elderly depressed patients. *Neuropharmacology.* 2010; 58(6): 940-9.

45. Perera T.D., Park S., Nemirovskaya Y. Cognitive role of neurogenesis in depression and antidepressant treatment. *Neuroscientia.* 2010; 14(4): 326-38.

46. Avram S., Borcan F., Borcan L.C., Milac A.L., Mihailescu D. QSAR Approaches Applied to Antidepressants Induced Neurogenesis — in vivo and in silico Applications. *Mini Rev. Med. Chem.* 2015; 16(3): 230-40.

47. Tang S.W., Helmeste D., Leonard B. Is neurogenesis relevant in depression and in the mechanism of antidepressant drug action? A critical review. *World J. Biol. Psychiatry.* 2012; 13(6): 402-12.

48. Wang H., Zhang Y., Qiao M. Mechanisms of extracellular signal-regulated kinase/ cAMP response element-binding protein/ brain-derived neurotrophic factor signal transduction pathway in depressive disorder. *Neural Regen. Res.* 2013; 8(9): 843-52.

49. Musazzi L., Cattaneo A., Tardito D., Barbon A., Gennarelli M., Barlati S. et al. Early raise of BDNF in hippocampus suggests induction of posttranscriptional mechanisms by antidepressants. *BMC Neurosci.* 2009; 10: 48. doi: 10.1186/1471-2202-10-48.

50. Gomazkov O.A. Signaling Molecules and Disturbances of Cognitive Functions in Brain Diseases. *Neyrokhimiya.* 2015; 9(3):169-80. (in Russian)

51. Eisch A.J., Cameron H.A., Encinas J.M., Meltzer L.A., Ming G.L., Overstreet-Wadiche L.S. Adult neurogenesis, mental health, and mental illness: hope or hype? *J. Neurosci.* 2008; 28(46): 11785-91.

52. Cattaneo E., Bonfanti L. Therapeutic potential of neural stem cells: greater in people's perception than in their brains? *Front Neurosci.* 2014; 8: 79. doi: 10.3389/fnins.2014.00079.

53. Ihunwo A.O., Tembo L.H., Dzamalala C. The dynamics of adult neurogenesis in human hippocampus. *Neural Regen. Res.* 2016; 11(12): 1869-1883. doi: 10.4103/1673-5374.195278.

54. Gomazkov O.A. Correction of Neurogenesis in the Adult Brain: Selection of Therapeutic Targets. *Neyrokhimiya.* 2017; 11(1):1-9. (in Russian)

55. Rhim J.H., Luo X., Xu X., Gao D., Zhou T., Li F. et al. A High-content screen identifies compounds promoting the neuronal differentiation and the midbrain dopamine neuron specification of human neural progenitor cells. *Sci. Rep.* 2015; 5: 16237. doi: 10.1038/srep16237.

56. Zhuang P., Zhang Y., Cui G., Bian Y., Zhang M., Zhang J., Liu Yet al. Direct stimulation of adult neural stem-progenitor cells in vitro and neurogenesis in vivo by salvianolic acid. *PLoS One.* 2012; 7(4):e35636. doi: 10.1371/journal.pone.0035636.

57. Kong S.Y., Park M.H., Lee M., Kim J.O., Lee H.R., Han B.W. et al. Kuwanon V inhibits proliferation, promotes cell survival and increases neurogenesis of neural stem cells. *PLoS One.* 2015; 10(2):e0118188. doi: 10.1371/journal.pone.0118188.

58. Liu A., Jain N., Vyas A., Lim L.M. Ventromedial prefrontal cortex stimulation enhances memory and hippocampal neurogenesis in the middle-aged rats. *ELife.* 2015; 4:e04803. doi: 10.7554/eLife.04803.

59. Paltsyn A.A., Komissarova S.V. Age changes in the brain. *Patologicheskaya Fiziologiya I eksperimentalnaya Terapiya.* 2015; 59(4):108-16. (in Russian)

© Кузник Б.И., 2017
УДК 616-092

Кузник Б.И.

GlycA — новый биомаркер воспалительных, онкологических, сердечно-сосудистых заболеваний, и предиктор смерти, независимо от причин, её вызывающих

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», 672090, г. Чита, Россия, ул. Горького, д. 39-а
Инновационная клиника «Академия здоровья», 672038, г. Чита, Россия, ул. Коханского, д. 13

В обзоре представлены данные о недавно (2015 г.) выявленном предикторе смерти, независимо от причин её вызывающих. На роль предиктора смерти претендует продукт ацетилирования гликопротеинов — GlycA (N-acetylglucosamine/galactosamine). Обсуждаются тонкие механизмы действия GlycA при воспалении, сердечно-сосудистой патологии, онкологических заболеваниях и диабете 2-го типа. Выявлены тесные корреляционные связи между содержанием GlycA и резистентностью к инсулину. С возрастом и увеличением массы тела (ИМТ) содержание GlycA повышается. Высокие концентрации GlycA обратно пропорциональны объему памяти и скорости обработки информации.

Ключевые слова: GlycA, воспалительные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, онкологические заболевания, диабет 2 типа, предиктор смерти.

Для цитирования: Кузник Б.И., GlycA — новый биомаркер воспалительных, онкологических, сердечно-сосудистых заболеваний, и предиктор смерти, независимо от причин, её вызывающих. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 136–141. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8533

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

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 07.02.2017

Kuznik B.I.

GlycA — a new biomarker of inflammation, cancer, cardiovascular disease and a predictor of death, regardless of its causes

Chita State Medical Academy, Gorkogo str. 39a, Chita, 672090, Russia
Innovative Clinic «Health Academy», Kokhanskogo str. 13, Chita, 672038, Russia

This review presents data on a recently discovered (2015) predictor for death regardless of its cause, a glycoprotein acetylation product, GlycA (biomarker of protein glycan N-acetyl groups). Subtle mechanisms of GlycA action in inflammation, cardiovascular diseases, cancer, and type 2 diabetes are discussed. A strong correlation of GlycA content with insulin resistance was found. The GlycA content increases with increasing age and body weight (BWI). High concentrations of GlycA are inversely proportional to global cognition, memory, and speed of information processing.

Keywords: GlycA, inflammatory diseases, cardiovascular diseases, cancer, type 2 diabetes, predictor of death.

For citation: Kuznik B.I. GlycA — a new biomarker of inflammation, cancer, cardiovascular disease and a predictor of death, regardless of its causes. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2017; 61 (4): 136–141. (in Russ.) DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8533

For correspondence: Kuznik Boris Ilitch, MD, Professor, Department of Normal Physiology Chita State Medical Academy (Gorkogo str. 39a, Chita, 672090) and scientific advisor of innovative clinic «Health Academy» (Kokhanskogo str. 13, Chita, 672038), e-mail: bi_kuznik@mail.ru.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 07.02.2017

Список аббревиатур:

ICAM-1 — интерцеллюлярная адгезивная молекула 1

IL — интерлейкин

hsCRP — высокочувствительный с-реактивный белок

HR — коэффициент риска

БОВ — белки острой фазы воспаления

ЗСН — застойная сердечная недостаточность

ИМ — инфаркт миокарда

ИМТ — индекс массы тела

МС — метаболический синдром

РА — ревматоидный артрит

СД — сахарный диабет

СКВ — системная красная волчанка

ЯМР — ядерный магнитный резонанс

В 2015 г. группа американских ученых, возглавляемая профессором Scott C. Ritchie, опубликовала в журнале Cell Systems сенсационные материалы об открытии нового предиктора смерти — промежуточного продукта ацетилирования гликопротеинов — GlycA (N-acetylglucosamine/galactosamine). Авторы установили, что при наличии хронических воспалительных заболеваний GlycA является пятилетним, для сердечнососудистой патологии — 14-летним, а для сахарного диабета 2-го типа — 17-летним предиктором смерти. Анализ данных по инфекционным заболеваниям, госпитализации и летальности, показал, что повышение концентрации GlycA увеличивало долгосрочный риск тяжелых нелокализованных и респираторных инфекций, особенно сепсиса и пневмонии. Авторами было изучено содержание GlycA более чем у 10 000 здоровых взрослых с целью определения биологических процессов, приводящих к высокому содержанию указанного метаболита. Полученные данные позволяли понять, почему у части людей существует высокий риск развития хронических заболеваний, таких, как сердечно-сосудистая патология и сахарный диабет 2-го типа, а также преждевременной смерти [1].

Одной из задач исследования было выяснения вопроса, существует ли связь между уровнем GlycA и перенесенным воспалением у практически здоровых лиц. Оказалось, что высокая концентрация GlycA связана с умеренным повышением 29 цитокинов, непосредственно участвующих в воспалении и иммунном ответе. У взрослых высокий уровень GlycA может сохраняться до десяти лет, что, по всей видимости, отражает состояние «мягкотекущего» хронического воспаления, хотя эти люди считают себя практически здоровыми. Кроме того, было установлено, что высокое содержание GlycA связано с повышением

числа лейкоцитов и усилением активности нейтрофилов, что свидетельствует не только о наличии скрытого воспалительного процесса, но и существовании риска возникновения тяжелой инфекции в будущем [1].

Обобщив полученные сведения, авторы [1] предлагают схему, отражающую влияние GlycA на исходы хронических воспалительных и инфекционных процессов, а также их воздействие на иммунную систему и содержание цитокинов (рисунок).

Из представленного рисунка видно, что после перенесенных воспалительных заболеваний высокий уровень GlycA может сохраняться на протяжении



Возможные механизмы действия GlycA [1].

многих лет. При этом возрастает активность иммунной системы, увеличивается содержание провоспалительных цитокинов, возрастает число лейкоцитов, повышается активность нейтрофилов. Наличие хронического воспаления приводит к летальному исходу не позднее чем через 14 лет.

GlycA — обобщенный биомаркер, являющийся интегративным показателем уровня протеинов и гликозилирования важнейших белков острой фазы воспаления (БОВ) в циркуляции [2]. Определение GlycA осуществляется с помощью метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [3]. Сигнал ЯМР улавливается от N-ацетил метильных остатков групп N-ацетилглюкозамина, расположенных на конкретных гликан-ветвях циркулирующих белков плазмы, главным образом α 1-кислого гликопротеина (орозомукоид), гаптоглобина, α 1-антитрипсина, α 1-антихемотрипсина и трансферрина [2, 3].

В исследованиях, проведенных на 5537 больных атеросклерозом из разных этнических групп, установлено, что существуют тесные корреляционные связи между содержанием GlycA и общими маркерами воспаления, такими, как высокочувствительный C-реактивный белок (hsCRP), фибриноген, интерлейкин-6 (IL-6) и сывороточный амилоид A, а также с уровнем холестерина и триглицеридов [2]. Показано, что GlycA тесно связан с лептин/адипонектин соотношением. На основании полученных данных высказано предположение, что жировая ткань принимает непосредственное участие в регуляции уровня белков острой фазы [4, 5].

E.G. Gurep и соавт. [6] проследили за судьбой 4759 человек с отсутствием на старте сердечно-сосудистой патологии и онкологических заболеваний. В среднем срок наблюдения составил 8,5 лет. У 298 чел. в процессе обследования патология сердечно-сосудистой системы была обнаружена впервые. После учета клинической картины и липидного спектра было установлено, что риск возникновения сердечно-сосудистой патологии для высшей квартили GlycA был равен 1,58 (95% CI 1,05—2,37, $p = 0,004$). Эта ассоциация сохранялась после дальнейшей корректировки функции почек (скорости клубочковой фильтрации и экскреции альбумина с мочой). Аналогичные результаты были получены для hsCRP. Авторы отмечают, что коэффициент риска (HR) возникновения сердечно-сосудистых заболеваний был наиболее высоким при одновременном повышении концентрации GlycA и hsCRP (HR: 1,79 (95% CI 1,31—2,46, $p < 0,001$). Обнаружены обратно пропорциональные соотношения содержания GlycA и hsCRP с одной стороны и экскрецией Na^+ за 24 часа — с другой [7, 8].

Не менее интересные факты были обнаружены R.W. McGarrah и соавт. [15], определявшими концентрацию GlycA методом спектроскопии протонного ядерного магнитного резонанса у 7617 чел. с различными заболеваниями. Авторами показано, что GlycA был связан с летальным исходом, независимо от причин к нему приводящим, с отношением рисков (HR) — 1,34, $p < 0,0001$. У пациентов с сердечно-сосудистой патологией HR соответствовал 1,37 $p < 0,0001$, а риск от других, не связанных с патологией сердечно-сосудистой системы, заболеваний — 1,46, $p < 0,0001$. Выявлена тесная прямая связь между содержанием GlycA и концентрацией липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), в том числе и их подклассами, а также сроками наступления летальных исходов. Одновременно обнаружена обратная корреляция между уровнями GlycA и липопротеинов высокой плотности (ЛПВП).

P.R. Lawler и соавт. [10] обследовали 27 524 здоровых женщины с целью выявления в дальнейшем основных причин смерти. При изучении независимой когорты, состоящей из 12 527 женщин, предполагалось сделать заключение для обоснования использования статинов. В основной группе было изучено появление вторичных сердечно-сосудистых заболеваний, а также смертность от онкологии. Средняя продолжительность наблюдений составила 20,5 года. За это время умерло 3523 женщины. Установлено, что при нарастании уровня GlycA, значительно увеличивался риск летального исхода независимо от причин к нему приводящим. В когорте ранее здоровых женщин риск летальности от сердечно-сосудистых заболеваний и рака также возрастал. На основании полученных данных сделан вывод, что повышение на протяжении жизни уровня циркулирующего GlycA связано с возрастанием риска смерти от любых причин, в том числе сердечно-сосудистой и онкологической патологии.

A.O. Akinkuolie и соавт. [11] определяли GlycA у 12 527 мужчин и женщин с наличием воспалительных процессов, но без явных признаков патологии сердечно-сосудистой системы до рандомизации, а у 10 039 из них через 1 год после её проведения. При дальнейшем наблюдении в течение 5 лет заболевания сердечно-сосудистой системы выявлены в 310 случаях (медиана 1,9). У больных содержание GlycA в крови минимально изменялось после 1 года лечения (снижение на 6,8% и 4,7% в группах принимавших розувастатин и плацебо соответственно). Установлено, что базовый уровень GlycA был связан с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний. Концентрация GlycA во время терапии также зависела от наличия сердечно-сосудистых заболеваний.

Известно, что при системной красной волчанке (СКВ) в короткие сроки развиваются тяжелые атеросклеротические поражения сердечно-сосудистой системы. Исходя из этих данных, было проверено изменение липидного спектра и содержание GlucA у 52 больных СКВ, наблюдаемых на протяжении длительного периода [12]. Использование преднизолона у таких больных сопровождалось неблагоприятными сдвигами в липидном спектре: наблюдалось снижение уровня ЛПВП, увеличение ЛПНП и ЛПОНП, а также триглицеридов. В то же время использование препарата «Гидроксихлорохин» приводило к снижению концентрации ЛПНП и ЛПОНП. У больных СКВ обнаружено повышение уровня GlucA, что коррелировало с тяжестью патологического процесса и степенью развития атеросклеротических изменений. К сказанному следует добавить, что при СКВ выявляются довольно высокие прямые корреляционные отношения между уровнем GlucA с одной стороны и СОЭ, СРБ, Е-селектином, внутриклеточной адгезивной молекулой 1 (ICAM-1) и триглицеридами — с другой [13, 17].

Исследования, проведенные на юношах и девушках 6—8 классов, показали, что с возрастом содержание GlucA в общей когорте испытуемых незначительно снизилось. При этом выявлены гендерные различия: у девушек, учащихся 8 классов, по сравнению с теми, кто занимался в 6 классе, уровень GlucA повысился, тогда как у юношей — снизился. Среднее содержание GlucA было выше у девочек с повышенным ИМТ. Занятия по оздоровительной программе «фитнес» приводило к снижению концентрации GlucA. При увеличении индекса липопротеин-инсулиновой резистентности содержание GlucA возрастало [14]. Согласно данным М.А. Connolly и соавт. [15], содержание GlucA в значительной степени связано с развитием сахарного диабета 2-го типа, в то время как ассоциативные взаимосвязи для hsCRP при этом заболевании были незначительными. Увеличение уровня GlucA наблюдалось при метаболическом синдроме (МС), сопровождавшем и не сопровождавшем сахарный диабет. В то же время положительные корреляционные связи между уровнями GlucA и липопротеинсвязанной фосфолипазой A2 (Lp-ФЛА2) в значительной степени нивелировались при СД 2-го типа и МС [16].

D.A. Duprez и соавт. [17] исследовали содержание GlucA у 6523 мужчин и женщин, у которых отсутствовали выраженные признаки заболеваний сердечно-сосудистой системы, и которые в целом отличались относительно хорошим здоровьем. Наблюдение за ними продолжалось в среднем 12,1 года. Относительные показатели риска в зависимости от концентрации GlucA, IL-6 и D-димера для общей лета-

льности ($n = 915$), сердечно-сосудистых заболеваний ($n = 922$) и для воспалительных заболеваний (связанных с госпитализацией ($n = 1324$)), независимо от ковариат находились в пределах от 1,05 до 1,20. При этом, только GlucA был прогностическим фактором для всех случаев рака ($n = 663$). На основании приведенных данных, авторы приходят к выводу, что комбинированным биомаркером является только GlucA, ассоциируемый с риском для всех видов летальности (сердечно-сосудистые катастрофы, злокачественные новообразования и тяжелые воспалительные процессы, но лишь после регуляции показателей hsCRP, IL-6 и D-димера).

Целью наблюдений K. Dungan и соавт. [18] являлось изучение уровня GlucA у больных сахарным диабетом 2-го типа, находящихся в критическом состоянии. При этом были оценены традиционные и новые маркеры воспаления (GlucA) у 121 пациента, которым были поставлены диагнозы: застойная сердечная недостаточность (ЗСН), ЗСН с наличием инфекции (ИНФ) и другие. Уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) был приблизительно одинаков во всех обследуемых группах (8,0—9,2%, $\rho = 0,2$). Маркеры воспаления оказались повышенными, но самые высокие значения IL-6, СРБ и GlucA отмечались в группе с наличием инфекционных заболеваний, а высокие концентрации TNF α и ICAM-1 — в группе с застойной сердечной недостаточностью. Обнаружена высокая прямая корреляционная связь между GlucA, IL-6 и СРБ, уменьшением содержания гемоглобина и низкой скоростью клубочковой фильтрации. Кроме того, GlucA и другие воспалительные маркеры не были существенно связаны с приемом глюкозы или уровнем HbA1c. Среди госпитализированных но не тяжелобольных пациентов с диабетом 2-го типа показатель GlucA оказался самым высоким в группе с инфекционной патологией и был корреляционно связан с IL-6 и СРБ.

Между тем, С. Logenzo и соавт. [19], используя метод линейной регрессии, показали, что даже после корректировки демографических сведений (курения, физическая активность, содержание глюкозы и ИМТ) выявляются прямые независимые корреляционные связи между содержанием GlucA и резистентностью к инсулину.

Проспективные наблюдения, проведенные на 26 508 практически здоровых женщинах за период в среднем равный 17,2 годам, позволили установить взаимосвязь между базовым уровнем GlucA и развитием в дальнейшем сахарного диабета 2-го типа. За время наблюдения диабет проявился у 2087 женщин. Установлено, что чем выше был уровень GlucA, тем чаще и быстрее возникал диабет. Взаимосвязь GlucA с диабетом 2-го типа отмечена даже среди женщин

с базовым содержанием $HbA_{1c} < 5\%$ (31 ммоль/моль). Кроме того, установлена тесная взаимосвязь между $GlucA$ и ИМТ: риск возникновения диабета был значительно выше у лиц с ИМТ $< 25 \text{ кг/м}^2$, чем у женщин с повышенным ИМТ, соответствующим $\geq 30 \text{ кг/м}^2$. Последний факт трудно объяснить, ибо известно, что повышенное содержание белков острой фазы, таких, как α_1 -кислый гликопротеин, α_1 -антитрипсин и трансферрин, имеющих отношение к определению концентрации $GlucA$, является факторами риска для возникновения сахарного диабета 2-го типа. Для объяснения полученных данных требуется проведение дальнейших исследований [20].

Установлено, что содержание $GlucA$, $hsCRP$ и $LCAT$ -активность были значительно повышены у больных с МС, тогда как уровень билирубина оставался на сравнительно низких цифрах. Отмечены прямые сильные корреляционные связи между уровнем $GlucA$ и $hsCRP$, сывороточным амилоидом и $LCAT$ -активностью. Вместе с тем, и $GlucA$, и $hsCRP$ отрицательно коррелировали с уровнем билирубина независимо от наличия или отсутствия МС. По мнению исследователей, $GlucA$ является показателем тяжести воспалительного процесса, а повышение его концентрации сопровождается снижением уровня билирубина [4, 7].

Наблюдения, осуществленные на 50 людях с лёгкой и умеренной активностью ревматоидного артрита (РА), показали, что при этом заболевании, по сравнению с практически здоровыми лицами (39 чел., сопоставимых по возрасту, полу и массе тела), значительно повышен уровень традиционных маркеров воспаления — $COЭ$, $hsCRP$, $IL\ 1\beta$, $IL-6$, $IL-18$ и $TNF\alpha$. Особенно сильные взаимосвязи существуют между концентрацией $GlucA$, активностью патологического процесса и интенсивностью воспаления. Более того, оказалось, что уровень $GlucA$ при РА в значительной степени зависит от ИМТ, особенно при висцеральном ожирении и, в меньшей степени — от плотности мышц. У относительно здоровых людей $GlucA$ в большей мере был связан с кардиометаболическими маркерами: ИМТ, окружностью талии, ожирением и возможностью развития резистентности к инсулину. Необходимо указать, что в контрольной группе выявлялась довольно тесная связь между содержанием $GlucA$ и концентрацией $IL-18$, тогда как при РА такой взаимосвязи не обнаружено [21]. К сказанному следует добавить, что $GlucA$ при РА характеризует не только тяжесть заболевания, но и степень развития атеросклероза, в том числе кальциноза коронарных артерий [5].

При исследовании, проводимом на протяжении 19 лет в двух независимых когортах, включающих 27 495 чел., выявлено 337 случаев заболевания раком прямой кишки (из них 103 случая со смертельным исходом). Оказалось, что при раке значительно возрастает концентрация $GlucA$. Чем тяжелее протекает заболевание, тем значительно изменяется содержание $GlucA$. Обнаружена тесная связь между уровнем $GlucA$ и летальным исходом. Следует отметить, что при этом не выявлено такой тесной связи между смертностью и концентрацией $hsCRP$ [22].

Содержание $GlucA$ значительно возрастало у детей в острой стадии болезни Кавасаки (БК) не только по сравнению со здоровыми детьми, или выздоравливающими пациентами, но и лихорадящими больными, поражёнными бактериальными или вирусными инфекциями. У больных БК в острой стадии наблюдалось увеличение количества лимфоцитов, ЛПНП, уменьшение общей концентрации ЛПВП по сравнению со здоровыми детьми и пациентами с другими заболеваниями, сопровождавшимися лихорадкой. В то же время отношение ЛПНП к ЛПВП было выше в острой фазе у больных БК, чем во всех других исследуемых группах ($p < 0,0001$). По содержанию $GlucA$, CRP , скорости седиментации эритроцитов, отношению ЛПНП/ЛПВП можно было отличить пациентов с БК от остальных больных. Эти различия особенно резко проявлялись через 6—10 дней после начала болезни [23, 24].

У больных псориазом с незначительными отклонениями в деятельности сердечно-сосудистой системы и умеренными кожными высыпаниями содержание $GlucA$ в крови оказалось повышенным. Чем тяжелее протекало заболевание, тем значительно возрастала концентрация $GlucA$. При комбинации псориаза и ишемической болезни сердца, а также при присоединении онкологии повышение содержания $GlucA$ было более существенным [25].

Оригинальные исследования были проведены I. Cohen-Manheimetal и соавт. [26], изучавшими содержание лейкоцитов, уровень $GlucA$, CRP , и фибриногена у людей в возрасте 18—22, 28—32, 41—46 и 48—52 лет. Полученные данные были сопоставлены с основными показателями когнитивных функций. Модели множественной регрессии были скорректированы для возраста, пола, социально-демографических характеристик, курения, ИМТ и свободного времени активной деятельности. Оказалось, что высокие показатели концентрации $GlucA$ были обратно пропорциональны объёму знаний, памяти и скорости обработки информации.

Все представленные в обзоре данные свидетельствуют о том, что $GlucA$ является новым наиболее надёжным маркером, характеризующим интенсивность

воспалительных процессов. Безусловно, следует согласиться с мнением J.D. Otvos и соавт. [2], утверждающих, что GlycA это уникальный биомаркер воспалительных процессов, независимо от их природы, который не только дополняет, но и предоставляет значительные преимущества перед существующими клиническими маркерами системного воспаления.

References

- Ritchie S.C., Wurtz P., Nath AP. et al. The biomarker GlycA is associated with chronic inflammation and predicts long-term risk of severe infection. *Cell Systems*. 2015. 1:1-9. doi:10.1016/j.cels.2015.09.007.
- Otvos D., Wolak-Dinsmore, Shalaurova I., J. et al. GlycA: a composite nuclear magnetic resonance biomarker of systemic inflammation. *Clin. Chem*. 2015; 61: 714-23.
- Alla-Korpela M. Serum nuclear magnetic resonance spectroscopy one more step toward clinical utility. *Clin. Chemj*. 2015; 61: 681-3.
- Dullaart R.P., Gruppen E.G., Connelly M.A. et al. GlycA, a biomarker of inflammatory glycoproteins, is more closely related to the leptin/adiponectin ratio than to glucose tolerance status. *Clin. Biochem*. 2015; 48: N12, 811-4.
- Ormseth M.J., Chung C.P., Oeser A.M. et al. Utility of a novel inflammatory marker, GlycA, for assessment of rheumatoid arthritis disease activity and coronary atherosclerosis. *Arthritis Res. Ther*. 2015; 17: 117-25.
- Gruppen E.G., Riphagen I.J., Connelly M.A. et al. GlycA, a Pro-Inflammatory Glycoprotein Biomarker, and Incident Cardiovascular Disease: Relationship with C-Reactive Protein and Renal Function. *PLoS One*. 2015; 23; 10(9):e0139057. doi: 10.1371/journal.pone.0139057.eCollection 2015.
- Gruppen E.G., Connelly M.A., Otvos J.D. et al. A novel protein glycan biomarker and LCAT activity in metabolic syndrome. *Eur. J. Clin. Investig*. 2015; 45: 850-9.
- Gruppen E.G., Connelly M.A., Vart P. et al. GlycA, a novel proinflammatory glycoprotein biomarker, and high-sensitivity C-reactive protein are inversely associated with sodium intake after controlling for adiposity: the Prevention of Renal and Vascular End-Stage Disease study. *Am J Clin Nutr*. 2016; Jun 15. pii: ajcn133744.
- McGarrah R.W., Kelly J.P., Craig D.M. et al. A Novel Protein Glycan-Derived Inflammation Biomarker Independently Predicts Cardiovascular Disease and Modifies the Association of HDL Subclasses with Mortality. *Clin Chem*. 2017; 63(1): 288-96. doi: 10.1373/clinchem.2016.261636.
- Lawler P.R., Akinkuolie A.O., Chandler P.D. et al. Circulating N-Linked Glycoprotein Acetyls and Longitudinal Mortality Risk. *Circ Res*. 2016; 1; 118(7): 1106-15.
- Akinkuolie A.O., Pradhan A.D., Buring J.E. Novel protein glycan side-chain biomarker and risk of incident type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015; 35: N6: 1544-50.
- Durcan L, Winegar DA, Connelly MA et al. Longitudinal Evaluation of Lipoprotein Variables in Systemic Lupus Erythematosus Reveals Adverse Changes with Disease Activity and Prednisone and More Favorable Profiles with Hydroxychloroquine. *Therapy J Rheumatol*. 2016 Apr;43(4):745-50. doi: 10.3899/jrheum.150437. Epub 2016 Feb 1.
- Chung CP, Ormseth MJ, Connelly MA et al. GlycA, a novel marker of inflammation, is elevated in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2016; 25: N3:296-300.
- Jago R, Drews KL, Otvos JD et al. Novel measures of inflammation and insulin resistance are related to obesity and fitness in a diverse sample of 11-14 year-olds: *The HEALTHY study Int J Obes (Lond)*. 2016; May 4. doi: 10.1038/ijo.2016.84.
- Connelly MA, Gruppen EG, Wolak-Dinsmore J, Matyus SP, Riphagen IJ, Shalaurova I, Bakker SJ, Otvos JD, Dullaart RP. GlycA, a marker of acute phase glycoproteins, and the risk of incident type 2 diabetes mellitus: PREVENT study. *Clin Chim Acta*. 2016;Jan 15;452:10-7. doi: 10.1016/j.cca.2015.11.001. Epub 2015 Nov 5.
- Gruppen EG, Connelly MA, Dullaart RP. Higher circulating glycoprotein glycoprotein biomarker, relates to lipoprotein-associated phospholipase A2 mass in nondiabetic subjects but not in diabetic or metabolic syndrome subjects. *J Clin Lipidol*. 2016;10: N3:512-8.
- Duprez D.A., Otvos J., Sanchez O.A. et al. Comparison of the Predictive Value of GlycA and Other Biomarkers of Inflammation for Total Death, Incident Cardiovascular Events, Noncardiovascular and Noncancer Inflammation-Related Events, and Total Cancer Events. *Clin Chem*. 2016; May 12. pii: clinchem.2016.255828.
- Dungan K., Binkley P., Osei K. GlycA is a Novel Marker of Inflammation Among Non-Critically Ill Hospitalized Patients with Type 2 Diabete. *Inflammation*. 2015;38: N3:1357-63.
- Lorenzo C., Festa A., Hanley A.J. et al. Novel Protein Glycan-Derived Markers of Systemic Inflammation and C-Reactive Protein in Relation to Glycemia, Insulin Resistance, and Insulin Secretion. *Diabetes Care*. 2016; Dec 28. pii: dc161569. doi: doi: 10.2337/dc16-1569.
- Akinkuolie A.O., Pradhan A.D., Buring J.E. Novel protein glycan side-chain biomarker and risk of incident type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35: N6:1544-50.
- Bartlett D.B., Connelly M.A., AbouAssi H. et al. A novel inflammatory biomarker, GlycA, associates with disease activity in rheumatoid arthritis and cardio-metabolic risk in BMI-matched controls. *Arthritis Res Ther*. 2016; Apr 12;18:86. doi: 10.1186/s13075-016-0982-5.
- Chandler P.D., Akinkuolie A.O., Tobias D.K. et al. Association of N-Linked Glycoprotein Acetyls and Colorectal Cancer Incidence and Mortality. *LoS One*. 2016; Nov 30;11(11):e0165615. doi: 10.1371/journal.pone.0165615.
- Connelly M.A., Shimizu C., Winegar D.A. et al. Differences in GlycA and lipoprotein particle parameters may help distinguish acute kawasaki disease from other febrile illnesses in children. *BMC Pediatr*. 2016 Sep 5;16(1):151. doi: 10.1186/s12887-016-0688-5.
- Connelly M.A., Shalaurova I., Otvos J.D. High-density lipoprotein and inflammation in cardiovascular disease. *Transl Res*. 2016 Jul;173:7-18.
- Joshi A.A., Lerman J.B., Abera T.M. et al. GlycA Is a Novel Biomarker of Inflammation and Subclinical Cardiovascular Disease in Psoriasis. *Circ Res*. 2016 Nov 11;119(11):1242-1253.
- Cohen-Manheim I., Doniger G.M., Sinnreich R. et al. Increase in the Inflammatory Marker GlycA over 13 Years in Young Adults Is Associated with Poorer Cognitive Function in Midlife. *PLoS One*. 2015 Sep 25;10(9):e0138036. doi: 10.1371/journal.pone.0138036. eCollection 2015.

© Коллектив авторов, 2017
УДК

Стамбольский Д.В.¹, Плеханова О.С.¹, Юдина И.Ю.⁷, Калинина Н.И.¹,
Карагяур М.Н.², Дубров В.Э.¹, Кочиш А.Ю.³, Семина Е.В.^{1,4}, Акопян Ж.А.^{1,2},
Голубев И.О.⁵, Антонов А.В.⁶, Сафин Ш.М.⁶, Ткачук В.А.^{1,4}

Система мозгового нейротрофического фактора (BDNF) как мишень для создания лекарственных средств, восстанавливающих иннервацию

¹ Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия

² Медицинский научно-образовательный центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия

³ Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена, г. Санкт-Петербург, Россия

⁴ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава России, г. Москва, Россия

⁵ Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, Москва, Россия

⁶ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Республиканская клиническая больница им. Г.Г. Куватова, г. Уфа, Башкортостан

⁷ Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова ИПО

Мозговой нейротрофический фактор (BDNF) является одним из основных нейротрофических факторов, участвующих в поддержании функционирования и регенерации нервной системы. В последние годы BDNF рассматривают как многообещающую терапевтическую мишень, на основании полученных данных о том, что BDNF улучшает регенерацию нейронов. **Цель** обзора — суммировать данные об экспрессии BDNF, его сигнализации, эффектах и механизмах стимуляции реиннервации. Анализ исследований последних десятилетий позволяет сделать заключение о целесообразности и перспективности разработок, направленных на создание лекарственных препаратов на основе BDNF для регенерации компонентов нервной системы.

Ключевые слова: мозговой нейротрофический фактор; иннервация; регенерация нервов.

Для цитирования: Стамбольский Д.В., Плеханова О.С., Юдина И.Ю., Калинина Н.И., Карагяур М.Н., Дубров В.Э., Кочиш А.Ю., Семина Е.В., Акопян Ж.А., Голубев И.О., Антонов А.В., Сафин Ш.М., Ткачук В.А. Система мозгового нейротрофического фактора (BDNF) как мишень для создания лекарственных средств, восстанавливающих иннервацию. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 142—152. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8534

Для корреспонденции: Стамбольский Дмитрий Викторович, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, e-mail: dstambolsky@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №14-24-00086) с использованием оборудования, приобретенного за счёт средств Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.05.2017

Stambolsky D.V.¹, Plekhanova O.S.¹, Yudina I.Yu.⁷, Kalinina N.I.¹,
Karagyaour M.N.², Dubrov V.E.¹, Kochish A.Yu.³, Semina E.V.^{1,4}, Akopyan Zh.A.^{1,2},
Golubev I.O.⁵, Antonov A.V.⁶, Safin Sh.M.⁶, Tkachuk V.A.^{1,4}

The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) system as a therapeutical target for development of drugs restoring innervation

¹ Department of Basic Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Medical Research and Education Center of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ P.P. Vreden Russian Research Institute of Traumatology and Orthopedics, St. Petersburg, Russia

⁴ Russian Cardiology Research Center, Moscow, Russia

⁵ N.N. Priorov Central Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Moscow, Russia

⁶ G.G. Kuvatov Bashkortostan Republican Clinical Hospital, Ufa, Bashkortostan

⁷ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a major neurotrophic factor maintaining the nervous system function and regeneration. Based on reports indicating that BDNF enhances neuronal regeneration, in recent years, BDNF has been considered a promising therapeutic target. The **aim** of this review was to summarize current data on BDNF expression, sig-

nalng, and mechanisms for stimulation of reinnervation. **Conclusion.** Recent studies of the role of BDNF showed that continuation of research and development of BDNF-based drugs stimulating regeneration of nervous system components is advisable and promising.

Keywords: brain-derived neurotrophic factor, innervation, nerve regeneration.

For citation: Stambolsky D.V., Plekhanova O.S., Yudina I.Yu., Kalinina N.I., Karagiaur M.N., Dubrov V.E., Kochish A.Yu., Semina E.V., Akopyan Zh.A., Golubev I.O., Antonov A.V., Safin Sh.M., Tkachuk V.A. The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) system as a therapeutical target for development of drugs restoring innervation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(4): 142—152. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8534

For correspondence: Dmitriy V. Stambolsky, Ph.D., Leading Researcher, Faculty of medicine, Lomonosov Moscow State University, e-mail: dstambolsky@gmail.com

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

Acknowledgments. Source of funding: Grant of the Russian Science Foundation (No. 14-24-00086). The authors acknowledge that the work was carried out using equipment purchased with the funding from the Program of Development of M.V. Lomonosov Moscow State University.

Received 29.05.2017

Введение

Увеличение продолжительности жизни человека ставит перед обществом задачу обеспечения активного долголетия. В связи с этим, длительное поддержание функциональной активности и разработка способов восстановления нервной системы становятся все более актуальными. В мире все больше средств вкладывается в исследования и разработки в области когнитивных и нейронаук. Актуальными задачами признаются исследования лежащих в основе функционирования нервной системы механизмов обновления и регенерации нервной системы, а также исследования молекулярных механизмов, лежащих в основе обеспечения когнитивных функций.

Наш коллектив более 20 лет занимается исследованиями в области регенеративной медицины. Одним из направлений этих исследований является исследование молекулярных механизмов регенеративной активности мезенхимальных стромальных клеток (МСК) на посттравматическую реиннервацию. В ходе этих исследований нами было показано, что регенеративная активность клеточных препаратов определяется секретлируемыми факторами роста и нейротрофинами, стимулирующими рост нейритов и кровеносных сосудов и обеспечивающими выживание нейронов.

Результатом наших исследований стало создание геннотерапевтических препаратов, обеспечивающих длительную локальную продукцию белковых молекул, воспроизводящих регенераторную активность МСК. Среди ряда других молекул, стимулирующих реиннервацию, нами был выбран мозговой нейротрофический фактор (BDNF — brain-derived neurotrophic factor). Этот фактор был выбран потому, что он является одним из основных нейротрофических факторов, участвующих в поддержании и регенерации нервной системы. Он не только обеспечивает морфо-

генез и стимулирует регенерацию центральной и периферической нервной системы, но и обеспечивает выживание нейронов, временно лишенных морфофункциональных связей с иннервируемыми органами или тканями. Он стимулирует выживание и восстановление как двигательных, так и некоторых чувствительных нейронов после травмы [1].

Экспрессия BDNF

BDNF наряду с фактором роста нервов (NGF) и нейротрофинами (NT-3, NT-4, NT 4/5 и NT-6) относится к семейству нейротрофинов млекопитающих [2, 3]. BDNF активно экспрессируется в развивающемся и взрослом мозге млекопитающих, в телах нейронов, дендритах, а также микроглии и эндотелиальных клетках церебральных артериол [4]. На периферии он экспрессируется эндотелием сосудов, в нервномышечных синапсах, мышцах и печени [5].

BDNF был впервые описан в 1987 г как белок с молекулярной массой 13 кДа [6]. BDNF синтезируется в виде пробелка массой 32кДа, состоящего из 247 аминокислот [7], и подвергается расщеплению внеклеточными протеазами такими, как плазмин и металлопротеиназы [8, 9]. Доказана роль урокиназной системы в протеолитической активации BDNF и ряда других нейротрофических факторов [10]. Зрелая форма BDNF (14 kDa) высвобождается нейронами механизмами как постоянной, так и активируемой секреции [7]. Методами иммунопреципитации было показано существование другой минорной про-формы BDNF — 28kDa [11]. Пробелки для достижения биологической активности подвергаются посттрансляционной модификации. Зрелая форма BDNF является критически важной для защиты мозга при ишемии [12].

Рецепторы BDNF и сигнализация

Показано, что в форме пробелка BDNF, связываясь с низкоаффинным рецептором зрелого BDNF $\rho 75^{NTR}$ с высокой аффинностью [13], вместо поддержки выживания через активацию каспаз запускает апоптоз [14] (рис. 1). Нейротрофиновый рецептор $\rho 75^{NTR}$ ($\rho 75$) относится к семейству рецепторов фактора некроза опухолей (TNF). В основном он экспрессируется при раннем развитии нейронов, тогда как у взрослых его экспрессия ограничена холинергическими нейронами и некоторыми нейронами кортекса [15], экспрессия также возрастает при патологических состояниях, таких, как эпилепсия или нейродегенерация [16]. Низкоаффинный рецептор $\rho 75^{NTR}$ связывается с про-формами нейротрофинов с высокой аффинностью и индуцирует сигнализацию, вызывая эффекты противоположные рецепторам TrkB [17]. Так, про-форма BDNF стимулирует выживание нейронов через TrkB, а активируя $\rho 75^{NTR}$, способствует смерти нейронов. Количество про-формы BDNF является критическим для смерти нейронов [18].

Зрелая форма BDNF сохраняет способность связываться с $\rho 75^{NTR}$, но связывание становится низкоаффинным. Предполагается, что $\rho 75^{NTR}$ является корецептором для зрелой формы BDNF и может усиливать или ослаблять его эффекты при взаимодействии с Trk рецепторами. Продемонстрирована экспрессия $\rho 75^{NTR}$ нейрональными клетками предшественниками, локализованными в нишах головного мозга, показано, что от его экспрессии зависит нейрогенный потенциал клеток предшественников [19].

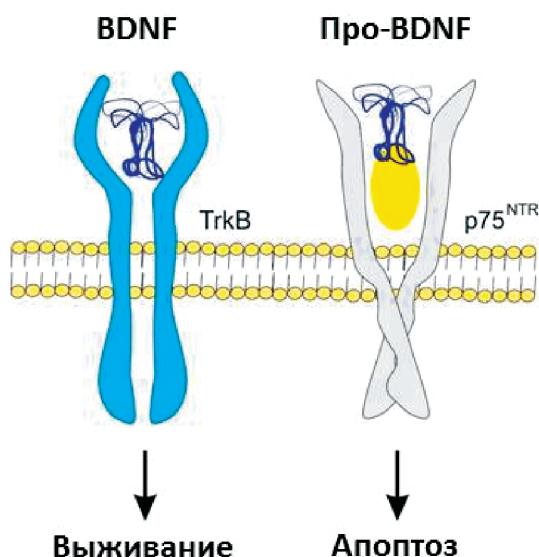


Рис. 1. Рецепторы BDNF и про-BDNF. BDNF, связываясь с рецептором TrkB, индуцирует активацию сигнальных путей, ведущих к выживанию клеток. Про-BDNF связывается с $\rho 75^{NTR}$, что приводит к апоптозу. BDNF, мозговой нейротрофический фактор; $\rho 75^{NTR}$, $\rho 75$ рецептор нейротрофинов [из 87].

BDNF и его рецептор TrkB экспрессируются в развивающемся и во взрослом мозге млекопитающих и принимают участие в регуляции процессов дифференцировки нейронов, регуляции формирования синапсов, а также обеспечивают выживание интегрированных в нервную систему нейронов. Зрелая форма BDNF через активацию рецептора TrkB активирует сигнальные пути MAPK/ERK, PLC и PI-3K и тем самым поддерживает выживание [20]. Между этими сигнальными путями были обнаружены перекрестные взаимодействия (рис. 2).

Некоторые изоформы TrkB были выявлены в ЦНС млекопитающих. Полноразмерная изоформа TrkB является типичной тирозиновой киназой, которая гомодимеризуясь при связывании с лигандом вызывает внутриклеточное тирозиновое фосфорилирование [21]. Кроме того, в нейронах и глии обнаружены усеченные формы TrkB, лишённые тирозинкиназного компонента; так T1, экспрессируясь в мозге, может действовать как доминантно-негативный ингибитор сигнализации BDNF, образуя гетеродимеры с полноразмерным TrkB [22]. Также были выявлены 2 дополнительных белка, связывающих BDNF — это карбоксипептидаза E (CPE) и сортилин. Связывание BDNF с CPE необходимо для его сортировки в секреторные везикулы, а сортилин локализован с BDNF в секреторных гранулах нейронов. Полагают, что CPE и сортилин возможно участвуют в регуляции внутриклеточной локализации BDNF в нейронах [23].

Роль BDNF

BDNF поддерживает выживание и рост нейритов у мотонейронов, симпатических и дофаминергических нейронов, ганглиозных клеток сетчатки. В работах, посвященных исследованиям нейродегенеративных заболеваний, ишемических повреждений и травм ЦНС установлено, что BDNF обладает выраженными нейрозащитными свойствами, угнетает клеточный апоптоз [24, 25], препятствует гибели нейронов [26, 27], стимулирует рост холинергических нервных волокон [28]. Показано, что BDNF поддерживает рост спинальных сенсорных и моторных нервных клеток [29], а также дофаминергических нейронов черной субстанции, холинергических и ГАМКергических нейронов коры головного мозга [30]. Введение BDNF стимулирует повышение ноцицептивной чувствительности спинальных нейронов [31].

В настоящее время проводятся исследования BDNF при различных физиологических и патологических состояниях с целью использования системы BDNF в качестве мишени для создания лекарственных средств. Показано, что BDNF играет важную

роль в регуляции многих процессов. Так, обнаружено, что при развитии ЦНС пик концентрации BDNF в головном мозге приходится на молодые годы, а относительно постоянные уровни определяются в зрелом и в старческом возрасте [32]. Интересен тот факт, что возрастание уровня BDNF совпадает с периодом, когда лобная кора созревает структурно и функционально [32], а преобладание в развивающемся мозге про-формы BDNF, которая не трансформируется в активную форму, делает развивающийся мозг более чувствительным к ишемии [4].

BDNF иммуногистохимически выявляется в клетках нервных ганглиев, локализованных в кишечных нервных сплетениях мышечной оболочки и на базальной мембране между продольным и поперечным слоями гладкомышечных клеток [33].

Установлено, что нарушения когнитивных функций у взрослого человека могут быть связаны с нарушениями выработки BDNF в гиппокампе [34]. Продемонстрирована статистически значимая связь между концентрацией BDNF в головном мозге с аффективными нарушениями и снижением памяти [35]. Ген BDNF локализован в коротком плече 11 хромосомы (11p14.1) его полиморфизм BDNF Val66Met связывают с психическими заболеваниями, такими, как шизофрения, тревожные и депрессивные расстройства [36].

В рамках моноаминовой гипотезы депрессии рассматривается механизм нарушения экспрессии генов-мишеней для нейротрофических факторов и, прежде всего, BDNF. Стресс может быть причиной

снижения экспрессии BDNF, что может приводить к апоптозу нейронов гиппокампа и, впоследствии, даже к его атрофии. Ассоциация депрессии с уровнем BDNF подтверждена метаанализом результатов клинических исследований, в ходе которых отслеживалась его концентрация [37]. Было обнаружено, что некоторые антидепрессанты действуют через рецепторы BDNF [38, 39]. Показано, что введение BDNF в дорсальное ядро шва воспроизводит эффекты антидепрессантов в модели «выработанной беспомощности» [40]. BDNF участвует в развитии дофаминергических систем мозга и взаимодействует с мезолимбическими дофаминергическими системами, участвующими в механизмах действия антипсихотических лекарств и в механизмах определяющих злоупотребление наркотическими веществами [25]. Хроническое применение антидепрессантов не только приводит к повышению экспрессии BDNF, но может также вызывать субклеточное перераспределение нейротрофинов [41]. Стресс, спровоцированный имобилизацией, стимулирует повышение экспрессии мРНК BDNF [40].

BDNF также играет роль в определении предрасположенности к шизофрении; полиморфные повторы (GT)_n в гене BDNF могут быть использованы для прогнозирования чувствительности к фармакотерапии хлорпромазином [42]. Показано, что экспрессия BDNF и TrkB, ассоциирована с патогенезом алкогольной зависимости [43]. BDNF запускает и поддерживает экспрессию дофаминового D3 рецептора (DRD3) [25].

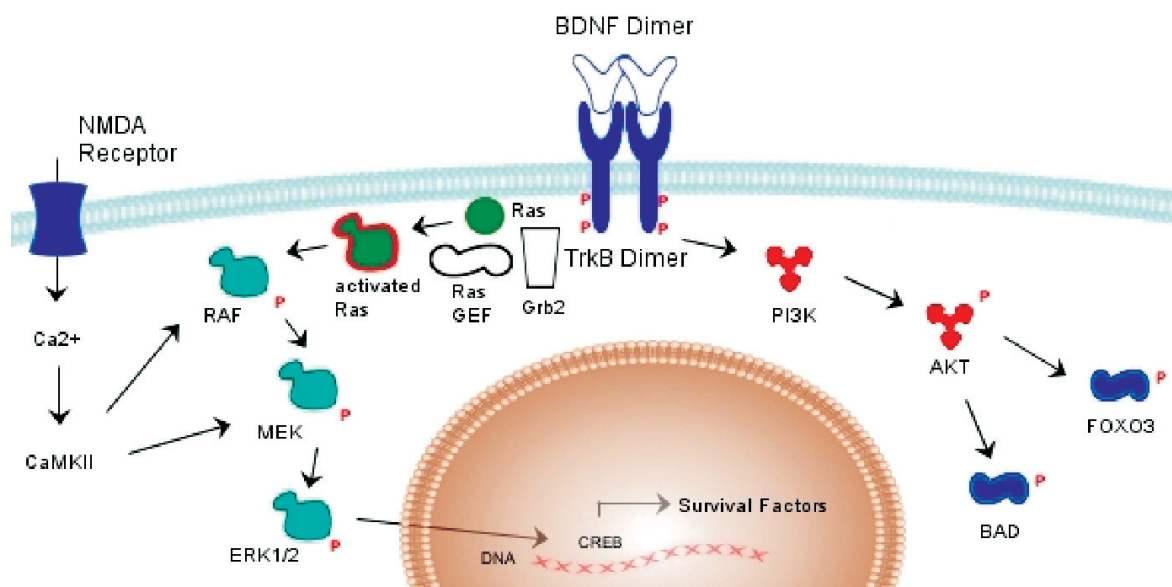


Рис. 2. Пример сигнального пути BDNF-TrkB, ведущего к выживанию клеток. BDNF активирует пути AKT и ERK1/2. PI3K вызывает фосфорилирование AKT, ингибирующие белки гибели клеток (FOXO3 и BAD). ERK1/2 фосфорилируется киназным каскадом (RAF - MEK – ERK1/2), активируемым RAS, который активируется RAS-GEF связыванием с Grb2, связанным с фосфорилированными TrkB димерами. Этот путь также может быть фосфорилирован CaMKII [из 88].

Было обнаружено, что снижение уровня экспрессии BDNF ассоциировано с нейродегенеративными заболеваниями, такими, как болезнь Альцгеймера [44], болезнь Хантингтона [45], и возрастной деменцией [46]. Продемонстрирована зависимость скорости прогрессирования болезни Альцгеймера от степени снижения экспрессии BDNF [47]. Показано снижение транскрипции BDNF в гиппокампе пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера [28].

Было выявлено, что BDNF стимулирует восстановление после экспериментального инсульта [48, 49]. Продемонстрировано, что предварительное введение продуцирующих BDNF фибробластов в головной мозг животных перед экспериментальным воспроизведением ишемии вызывает повышение экспрессии рецептора BDNF — TrkB и предотвращает гибель определенных групп нейронов гиппокампа [50]. Показано, что BDNF влияет на дифференцировку олигодендроцитов и миелинизацию после субкортикального ишемического инсульта [51]. Кроме того, BDNF стимулирует ангиогенез. Этот его эффект может быть объяснен тем, что сигнализация BDNF через TrkB вызывает 2—4-кратное увеличение транскрипции гена VEGF, причём этот эффект отменяется мутацией в области промотора гена VEGF [26], а также при повышении экспрессии урокиназы и матричных металлопротеиназ MMP-2 и MMP-9 в ответ на стимуляцию клеток BDNF [52].

Показано участие сигнализации BDNF в восприятии боли [53, 54], что позволяет надеяться на возможность разработки лекарственных средств на основе BDNF для лечения хронической боли. BDNF способен защищать клетки от гибели при химиотерапии [55]. Блокирование TrkB синтетическим ингибитором, или блокирование BDNF антителами повышает чувствительность к химиотерапии [56]. Клетки нейробластомы, экспрессирующие мРНК BDNF, но не имеющие трансмембранной активной формы TrkB, не дифференцируются в ответ на стимуляцию ретиноевой кислотой [57]. Обработка клеток нейробластомы ретиноевой кислотой приводит к повышению экспрессии не только TrkB, но и никотинового ацетилхолинового рецептора [58].

Также было обнаружено, что введение BDNF мышам с ожирением, индуцированным жировой диетой, и лишним рецептора меланокортина-4, приводит у них к уменьшению аппетита и снижению веса [59]. Показано, что ожирение у детей, страдающих WAGR-синдромом (орфанная патология, крупная хромосомная делеция), ассоциировано со снижением экспрессии BDNF [60]. Снижение экспрессии BDNF ассоциировано с патологическим повышением аппетита, ожирением, гиперактивностью и когнитивными расстройствами [24]. Показано, что полимор-

физмы гена BDNF могут быть факторами риска ожирения у мужчин, страдающих шизофренией и получающих антипсихотическую фармакотерапию, и у женщин со сниженным уровнем экспрессии BDNF [61]. Продукция BDNF зависит от приема пищи при голодании — после 48 часов она возрастает, а после возвращения к нормальному питанию восстанавливается [62]. Популяционные исследования европейских популяций демонстрируют зависимость анорексии и индекса массы тела от экспрессии BDNF [63].

Была выявлена значимая роль BDNF в стимуляции нейропластичности [64], что открывает новые перспективы для создания лекарственных средств, предназначенных для лечения сосудистых, травматических и нейродегенеративных заболеваний нервной системы и хронической боли. BDNF вовлечен в процессы синаптической пластичности, которая необходима для обучения и памяти. Он способствует увеличению сложности аксонального дерева, расширяя синаптическую территорию аксона, координирует образование синапсов и стабилизацию между пре- и постсинаптическими нейронами [65]. Было показано, что делеция одного аллеля гена BDNF вызывает нарушения обучаемости у мышей [66].

Антероградный аксональный транспорт обеспечивает доставку BDNF и нейротрофина 3 (NT3) к связанным с нейронами иннервируемыми тканям, где они функционируют как трофические факторы и как нейротрансмиттеры [67]. На линии нейробластомы показано, что BDNF участвует в запуске роста нейритов; подтверждено участие BDNF в регуляции синаптической передачи и формировании синапсов в ЦНС по аутокринным и паракринным механизмам [68, 69].

Было показано, что при повреждении нейронов, вызванном гипоксией, ишемией и нейротоксинами, экспрессия BDNF повышается и оказывает нейропротективный эффект [70, 71]. Также было обнаружено, что BDNF снижает гибель культивируемых дофаминовых нейронов, вызванную токсическим действием ротенона [72].

Повреждение периферических нервов зачастую является причиной инвалидности, поскольку скорость роста периферических нервов очень низкая, и функциональное восстановление в большинстве случаев остается неполным [73, 74]. Было обнаружено, что BDNF улучшает регенерацию периферических нервов [75]. Повышение уровня BDNF предотвращает смерть нейронов, усиливает нейрональную активность и способствует росту аксонов [1]. Напротив, сниженный уровень BDNF замедляет рост нейритов и ингибирует восстановление аксонов и ремиелинизацию [76]. После повреждения периферических нервов Шванновские клетки продуцируют и секретируют нейротрофические фак-

торы и в том числе BDNF. Известно, что Шванновские клетки являются основными клетками стромы в периферической нервной системе и играют ключевую роль во время роста и регенерации периферических нервов. После повреждения нерва Шванновские клетки участвуют в элиминации дегрида, дедифференцируются, образуя так называемые «диски Бюнгнера», делятся и мигрируют, обеспечивая направленный рост регенерирующих аксонов по направлению к денервированным мишеням [77, 78]. В то же время Шванновские клетки синтезируют и секретируют нейротрофические факторы, в частности, фактор роста нервов (NGF), BDNF, нейротрофин-3 и нейротрофин-4/5, повышая выживание и рост нейронов [78, 79]. Эти секретируемые нейротрофические факторы, в свою очередь, способствуют фенотипической модуляции Шванновских клеток и нейронов, формируя таким образом положительную обратную связь для развития нервов и регенерации [80, 81]. Еще одним источником нейротрофических факторов являются мезенхимальные стволовые клетки [82]. Обнаружено, что мезенхимальные стромальные клетки, выделяемые из жировой ткани, способны стимулировать рост нервных волокон и репарацию травмированного нерва, при этом паракринная секреция нейротрофических факторов, в частности BDNF, играет ключевую роль. Важнейшей находкой оказался тот факт, что блокирование BDNF полностью нейтрализует позитивный нейротрофический эффект мезенхимальных стромальных клеток [83]. Одну из интересных иллюстраций роли BDNF можно увидеть на рис. 3, отражающим максимальное повышение экспрессии BDNF и его рецептора после травмы нерва по сравнению с другими нейротрофическими факторами.

Поскольку нейротрофические факторы, в том числе, BDNF могут усиливать регенерацию нейронов, в последнее время полагают, что они обладают большим терапевтическим потенциалом при повреждении периферических нервов. Клиническое использование экзогенного BDNF до сих пор было ограниченным в связи со сложностями доставки, поддержания эффективной фармакотерапевтической дозы и возможного риска образования опухолей при введении высоких концентраций [76, 84—86]. Поиск эффективной стратегии клинического применения BDNF для восстановления периферической иннервации является актуальной задачей исследований в последние годы.

Поскольку доставка нейротрофических факторов к различным структурам нервной системы и длительное локальное поддержание их терапевтической концентрации все еще остается сложной задачей, для ее решения были использованы генотерапевтические подходы, с помощью которых возможно обеспечение длительной локальной продукции нейротрофинов. Нами были проведены доклинические исследования генотерапевтического препарата на основе BDNF. Результаты проведенных исследований продемонстрировали биологическую безопасность и специфическую активность разработанного препарата в отношении *посттравматического восстановления иннервации* [75].

Для осуществления генной терапии нами была создана модифицированная генетическая конструкция ρ Vax1-hBDNF. Эффективность экспрессии данной плазмиды в эукариотических клетках была подтверждена на клеточной линии HEK293T. Нами была разработана методика внутримышечной инъекции генетической конструкции и подобраны ее оптимальные

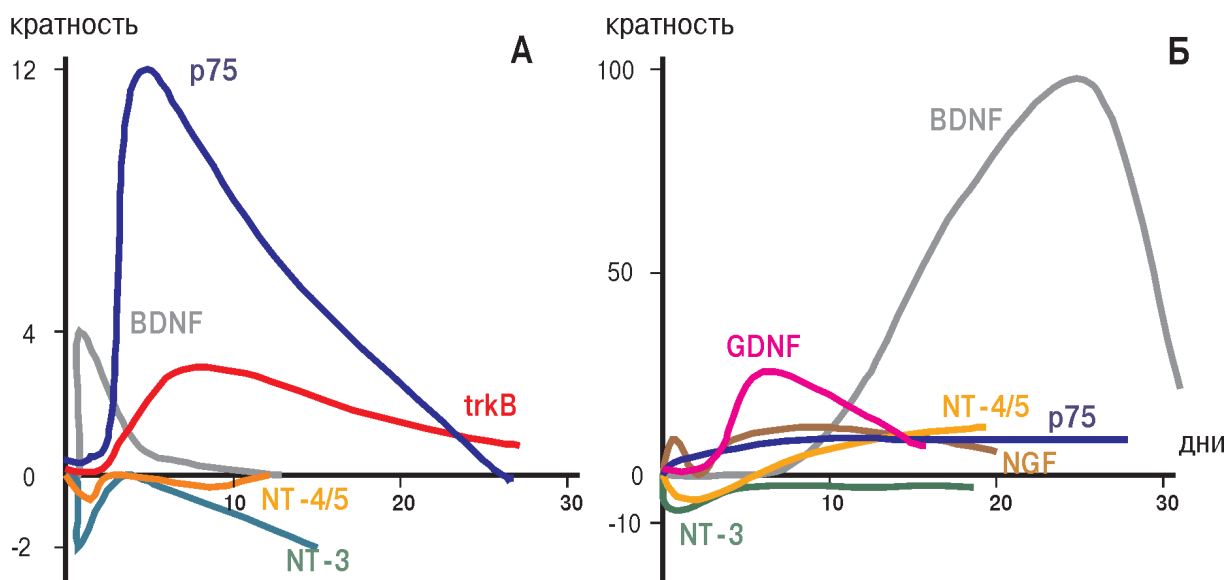
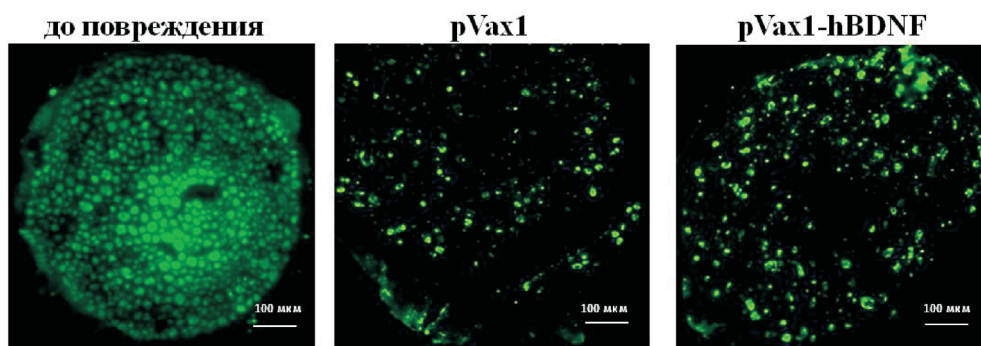


Рис. 3. Динамика экспрессии нейротрофических факторов и их рецепторов в травмированном нерве: А — в проксимальном конце нерва (тело нейрона), Б — в дистальном конце нерва (Шванновские клетки) [из 89].

характеристики. Эффективность такой методики была подтверждена при помощи плазмиды, кодирующей маркерный белок (β -галактозидазу), и с помощью контроля экспрессии pVax1-hBDNF в мышечном экспланте. Инъекция генетической конструкции pVax1-hBDNF стимулировала более полноценное восстановление нерва, то есть по данным электрофизиологического и морфологического исследования количество восстановившихся нервных волокон было значительно больше, чем в группе контроля. Таким образом, гиперэкспрессия BDNF в передней большеберцовой мышце (*m. tibialis ant.*) стимулировала восстановление травмированного периферического нерва (рис. 4).

В настоящее время проводятся клинические исследования генного лекарственного препарата на основе невирусной плазмидной конструкции, несущей ген

BDNF для стимуляции восстановления периферической иннервации. По результатам завершенной первой фазы клинических исследований препарат BDNF является безопасным для человека. На настоящий момент в двойное слепое плацебо-контролируемое исследование включено 27 пациентов. Исследователи у части пациентов наблюдают значительное ускорение восстановления иннервации, побочных эффектов не зарегистрировано, однако статистическая обработка данных будет проведена по завершению клинического исследования. Полученные нами результаты указывают на целесообразность продолжения исследований и разработок, направленных на создание лекарственных препаратов на основе BDNF для регенерации периферических нервов, а в перспективе и восстановления центральной нервной системы и когнитивных функций человека.



Введение pVax1-hBDNF увеличивает количество регенерирующих нервных волокон (через 7 суток)

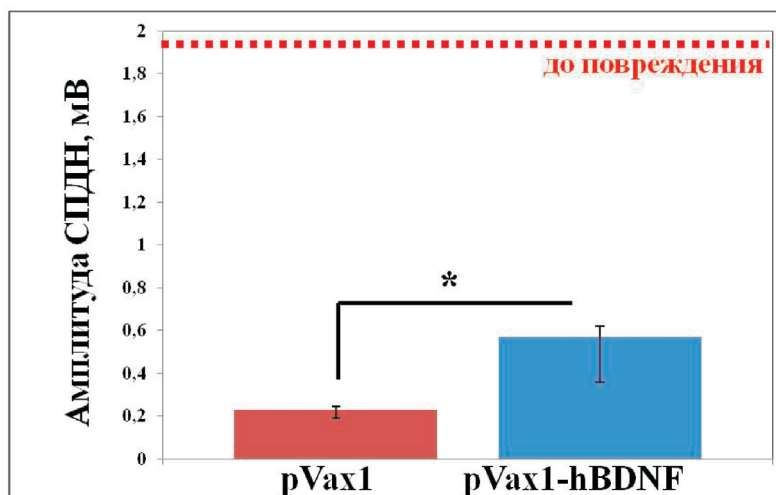


Рис. 4. Внутримышечная инъекция генетической конструкции pVax1-hBDNF достоверно увеличивает количество регенерировавших аксонов. Верхняя панель — поперечные срезы общего малоберцового нерва, 3 мм дистальнее места повреждения, 4-е сут. от момента повреждения: зеленое окрашивание соответствует локализации восстановившихся аксонов; иммунофлуоресцентная окраска срезов матрицел антителами против маркера аксонов — белка NF200. Нижняя панель — внутримышечная инъекция генетической конструкции pVax1-hBDNF статистически значимо увеличивает количество регенерировавших аксонов (*- $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля) [75].

Заключение

Наши и литературные данные свидетельствуют в пользу того, что система мозгового нейротрофического фактора является перспективной терапевтической мишенью. Препараты на основе BDNF могут влиять на синаптическую пластичность (восстановление после травм, после инсульта, ускорение обучения при работе с нейроинтерфейсами); высшую нервную деятельность (депрессию, память); ишемию мозга; ангиогенез; восприятие боли; течение нейродегенеративных заболеваний (болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона и др.); ожирение и восстановление периферической иннервации при травме нервов.

References

1. Lykissas M.G., Batistatou A.K., Charalabopoulos K.A., Beris A.E. The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration. *Curr Neurovasc Res.* 2007; 4: 143-51.
2. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science.* 1987; 237: 1154-62.
3. Gotz R., Koster R., Winkler C., Raulf F., Lottspeich F., Schartl M., Thoenen H. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature.* 1994; 372: 266-9.
4. Yang J., Siao C.J., Nagappan G., Marinic T., Jing D., Mc Grath K., Chen Z.Y., Mark W., Tessarollo L., Lee F.S., Lu B., Hempstead B.L. Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci.* 2009; 12: 113-5.
5. Cassiman D., Deneff C., Desmet V.J., Roskams T. Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin-receptors. *Hepatology.* 2001; 33: 148-58.
6. Barde Y.A., Edgar D., Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1982; 1: 549-53.
7. Mowla S.J., Farhadi H.F., Pareek S., Atwal J.K., Morris S.J., Seidah N.G., Murphy R.A. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem.* 2001; 276: 12660-66.
8. Lu B. Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation. *Neuron.* 2003; 39: 735-8.
9. Pang P.T., Teng H.K., Zaitsev E., Woo N.T., Sakata K., Zhen S., Teng K.K., Yung W.H., Hempstead B.L., Lu B. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science.* 2004; 306: 487-91.
10. Gray K., Ellis V. Activation of pro-BDNF by the pericellular serine protease plasmin. *FEBS Lett.* 2008; 582(6): 907-10.
11. Goodman L.J., Valverde J., Lim F., Geschwind M.D., Federoff H.J., Geller A.I., Hefti F. Regulated release and polarized localization of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci.* 1996; 7: 222-38.
12. Chen A., Xiong L.J., Tong Y., Mao M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomol Rep.* 2013; 1(2): 167-76.
13. Lee R., Kermani P., Teng K.K., Hempstead B.L. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science.* 2001; 294(5548): 1945-8.
14. Nykjaer A., Willnow T.E. Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends Neurosci.* 2012; 35(4): 261-70.
15. Angelo M.F., Aviles-Reyes R.X., Villarreal A., Barker P., Reines A.G., Ramos A.J. p75 NTR expression is induced in isolated neurons of the penumbra after ischemia by cortical devascularization. *J Neurosci Res.* 2009; 87: 1892-903.
16. Dechant G., Barde Y.A. The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci.* 2002; 5: 1131-6.
17. Ho R., Minturn J.E., Simpson A.M., Iyer R., Light J.E., Evans A.E., Brodeur G.M. The effect of P75 on Trk receptors in neuroblastomas. *Cancer Lett.* 2011; 305: 76-85.
18. Kenchappa R.S., Tep C., Korade Z., Urna S, Bronfman FC, Yoon SO, Carter BD. p75 neurotrophin receptor-mediated apoptosis in sympathetic neurons involves biphasic activation of JNK and up-regulation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme/ADAM17. *J Biol Chem.* 2010; 285: 20358-68.
19. Bernabeu R.O., Longo F.M. The p75 neurotrophin receptor is expressed by adult mouse dentate progenitor cells and regulates neuronal and non-neuronal cell genesis. *BMC Neurosci.* 2010; 11: 136-47.
20. Huang E.J., Reichardt L.F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2003; 72: 609-42.
21. Wong J., Woon H.G., Weickert C.S. Full length TrkB potentiates estrogen receptor alpha mediated transcription suggesting convergence of susceptibility pathways in schizophrenia. *Mol Cell Neurosci.* 2011; 46: 67-78.
22. Luberg K., Wong J., Weickert C.S., Timmusk T. Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *J Neurochem.* 2010; 113: 952-64.
23. Evans S.F., Irmady K., Ostrow K., Kim T., Nykjaer A., Saftig P., Blobel C., Hempstead B.L. Neuronal brain-derived neurotrophic factor is synthesized in excess, with levels regulated by sortilin-mediated trafficking and lysosomal degradation. *J Biol Chem.* 2011; 286: 29556-67.
24. Gray J., Yeo G.S., Cox J.J., Morton J., Adlam A.L., Keogh J.M., Yanovski J.A., El Gharbawy A., Han J.C., Tung Y.C., Hodges J.R., Raymond F.L., O'rahilly S., Farooqi I.S. Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Diabetes.* 2006; 55(12): 3366-33.
25. Krebs M.O., Guillain O., Bourdell M.C., Schwartz J.C., Olie J.P., Poirier M.F., Sokoloff P. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) gene variants association with age at onset and therapeutic response in schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2000; 5(5): 558-62.
26. Nakamura K., Martin K.C., Jackson J.K., Beppu K., Woo C.W., Thiele C.J. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1alpha in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 2006; 66(8): 4249-55.
27. Baj G., Tongiorgi E. BDNF splice variants from the second promoter cluster support cell survival of differentiated neuroblastoma upon cytotoxic stress. *J Cell Sci.* 2009; 122(Pt 1): 36-43.
28. Phillips H.S., Hains J.M., Armanini M., Laramee G.R., Johnson S.A., Winslow J.W. BDNF mRNA is

decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron*. 1991; 7(5): 695-702.

29. Barde Y.A., Davies A.M., Johnson J.E., Lindsay R.M., Thoenen H. Brain derived neurotrophic factor. *Prog Brain Res*. 1987; 71: 185-9.

30. Kuipers S.D., Bramham C.R. Brain-derived neurotrophic factor mechanisms and function in adult synaptic plasticity: new insights and implications for therapy. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2006; 9(5): 580-6.

31. Thompson S.W., Bennett D.L., Kerr B.J., Bradbury E.J., Mc Mahon S.B. Brain-derived neurotrophic factor is an endogenous modulator of nociceptive responses in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(14): 7714-8.

32. Waterhouse E.G., Xu B. New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. *Mol Cell Neurosci*. 2009; 42(2): 81-9.

33. Hoehner J.C., Wester T., Pahlman S., Olsen L. Localization of neurotrophins and their high-affinity receptors during human enteric nervous system development. *Gastroenterology*. 1996; 110(3): 756-67.

34. Castren E., Tanila H. Neurotrophins and dementia—keeping in touch. *Neuron*. 2006; 51(1): 1-3.

35. Kauer-Sant Anna M., Tramontina J., Andreazza A.C., Cereser K., da Costa S., Santin A., Yatham L.N., Kapczinski F. Traumatic life events in bipolar disorder: impact on BDNF levels and psychopathology. *Bipolar Disord*. 2007; 9(1): 128-135.

36. Chen Z.Y., Bath K., McEwen B., Hempstead B., Lee F. Impact of genetic variant BDNF (Val66Met) on brain structure and function. *Novartis Found Symp*. 2008; 289: 180-95.

37. Brunoni A.R., Lopes M., Fregni F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008; 11(8): 1169-80.

38. Saarelainen T., Hendolin P., Lucas G., Koponen E., Sairanen M., Mac Donald E., Agerman K., Haapasalo A., Nawa H., Aloyz R., Ernfors P., Castren E. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci*. 2003; 23(1): 349-57.

39. Jiang B., Huang C., Chen X.F., Tong L.J., Zhang W. Tetramethylpyrazine Produces Antidepressant-Like Effects in Mice Through Promotion of BDNF Signaling Pathway. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015; 18(8): 1-13.

40. Altar C.A. Neurotrophins and depression. *Trends Pharmacol Sci*. 1999; 20(2): 59-61

41. Calabrese F., Molteni R., Maj P.F., Cattaneo A., Gennarelli M., Racagni G., Riva M.A. Chronic duloxetine treatment induces specific changes in the expression of BDNF transcripts and in the subcellular localization of the neurotrophin protein. *Neuropsychopharmacology*. 2007; 32(11): 2351-9.

42. Xu M.Q., St Clair D., Feng G.Y., Lin Z.G., He G., Li X., He L. BDNF gene is a genetic risk factor for schizophrenia and is related to the chlorpromazine-induced extrapyramidal syndrome in the Chinese population. *Pharmacogenet Genomics*. 2008; 18(6): 449-57.

43. Davis M.I. Ethanol-BDNF interactions: still more questions than answers. *Pharmacol Ther*. 2008; 118(1): 36-57.

44. Jeronimo-Santos A., Fonseca-Gomes J., Guimaraes D.A., Tanqueiro S.R., Ramalho R.M., Ribeiro J.A., Sebastiao A.M., Diogenes M.J. Brain-derived neurotrophic

factor mediates neuroprotection against A β -induced toxicity through a mechanism independent on adenosine 2A receptor activation. *Growth Factors*. 2015; 33(4): 298-308.

45. Silva A., Naia L., Dominguez A., Ribeiro M., Rodrigues J., Vieira O.V., Lessmann V., Rego A.C. Overexpression of BDNF and Full-Length TrkB Receptor Ameliorate Striatal Neural Survival in Huntington's Disease. *Neurodegener Dis*. 2015; 15(4): 207-18.

46. Passaro A., Dalla Nora E., Morieri M.L., Soavi C., Sanz J.M., Zurlo A., Fellin R., Zuliani G. Brain-derived neurotrophic factor plasma levels: relationship with dementia and diabetes in the elderly population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015; 70(3): 294-302.

47. Laske C., Stellos K., Hoffmann N., Stransky E., Straten G., Eschweiler G.W., Leyhe T. Higher BDNF serum levels predict slower cognitive decline in Alzheimer's disease patients. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011; 14(3): 399-404.

48. Qin L., Kim E., Ratan R., Lee F.S., Cho S. Genetic variant of BDNF (Val66Met) polymorphism attenuates stroke-induced angiogenic responses by enhancing anti-angiogenic mediator CD36 expression. *J Neurosci*. 2011; 31(2): 775-83.

49. Rodriguez-Frutos B., Otero-Ortega L., Ramos-Cejudo J., Martinez-Sanchez P., Barahona-Sanz I., Navarro-Hernanz T., Gomez-de Frutos Mdel C., Diez-Tejedor E., Gutierrez-Fernandez M. Enhanced brain-derived neurotrophic factor delivery by ultrasound and microbubbles promotes white matter repair after stroke. *Biomaterials*. 2016; 100: 41-52.

50. Ferrer I., Ballabriga J., Marti E., Perez E., Alberch J., Arenas E. BDNF up-regulates TrkB protein and prevents the death of CA1 neurons following transient forebrain ischemia. *Brain Pathol*. 1998; 8(2): 253-61.

51. Ramos-Cejudo J., Gutierrez-Fernandez M., Otero-Ortega L., Rodriguez-Frutos B., Fuentes B., Vallejo-Cremades M.T., Hernanz T.N., Cerdan S., Diez-Tejedor E. Brain-derived neurotrophic factor administration mediated oligodendrocyte differentiation and myelin formation in subcortical ischemic stroke. *Stroke*. 2015; 46(1): 221-8.

52. Sun C.Y., Hu Y., Wang H.F., He W.J., Wang Y.D., Wu T. Brain-derived neurotrophic factor inducing angiogenesis through modulation of matrix-degrading proteases. *Chin Med J (Engl)*. 2006; 119(7): 589-95.

53. Tao W., Chen Q., Zhou W., Wang Y., Wang L., Zhang. Persistent inflammation-induced up-regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes synaptic delivery of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor GluA1 subunits in descending pain modulatory circuits. *J Biol Chem*. 2014; 289(32): 22196-04.

54. Tao W., Chen Q., Wang L., Zhou W., Wang Y., Zhang Z. Brainstem brain-derived neurotrophic factor signaling is required for histone deacetylase inhibitor-induced pain relief. *Mol Pharmacol*. 2015; 87(6): 1035-41.

55. Jaboin J., Kim C.J., Kaplan D.R., Thiele C.J. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res*. 2002; 62(22): 6756-63.

56. Ho R., Eggert A., Hishiki T., Minturn J.E., Ikegaki N., Foster P., Camoratto A.M., Evans A.E., Brodeur G.M. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res*. 2002; 62(22): 6462-6.

57. Kaplan D.R., Matsumoto K., Lucarelli E., Thiele C.J. Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neu-

roblastoma cells. *Eukaryotic Signal Transduction Group. Neuron*. 1993; 11(2): 321-31.

58. Serres F., Carney S.L. Nicotine regulates SH-SY5Y neuroblastoma cell proliferation through the release of brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res*. 2006; 1101(1): 36-42.

59. Xu B., Goulding E.H., Zang K., Cepoi D., Cone R.D., Jones K.R., Tecott L.H., Reichardt L.F. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci*. 2003; 6(7): 736-42.

60. Han J.C., Liu Q.R., Jones M., Levinn R.L., Menzie C.M., Jefferson-George K.S., Adler-Wailes D.C., Sanford E.L., Lacbawan F.L., Uhl G.R., Rennert O.M., Yanovski J.A. Brain-derived neurotrophic factor and obesity in the WAGR syndrome. *N Engl J Med*. 2008; 359(9): 918-27.

61. Zhang X.Y., Chen da C., Tan Y.L., Tan S., Luo X., Zuo L., Soares J.C. BDNF polymorphisms are associated with cognitive performance in schizophrenia patients versus healthy controls. *J Clin Psychiatry*. 2016; 77(8):e1011-8.

62. Bariohay B., Lebrun B., Moyses E., Jean A. Brain-derived neurotrophic factor plays a role as an anorexigenic factor in the dorsal vagal complex. *Endocrinology*. 2005; 146(12): 5612-20.

63. Ribases M., Gratacos M., Fernandez-Aranda F., Bellodi L., Boni C., Anderlueh M., Cristina Cavallini M., Cellini E., Di Bella D., Erzegovesi S., Foulon C., Gabrovsek M., Gorwood P., Hebebrand J., Hinney A., Holliday J., Hu X., Karwautz A., Kipman A., Komel R., Nacmias B., Remschmidt H., Ricca V., Sorbi S., Tomori M., Wagner G., Treasure J., Collier D.A., Estivill X. Association of BDNF with restricting anorexia nervosa and minimum body mass index: a family-based association study of eight European populations. *Eur J Hum Genet*. 2005; 13(4): 428-34.

64. Calabrese F., Rossetti A.C., Racagni G., Gass P., Riva M.A., Molteni R. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. *Front Cell Neurosci*. 2014 8: 430-7.

65. Sanchez A.L., Matthews B.J., Meynard M.M., Hu B., Javed S., Cohen Cory S. BDNF increases synapse density in dendrites of developing tectal neurons in vivo. *Development*. 2006; 133: 2477-86.

66. Bartoletti A., Cancedda L., Reid S.W., Tessarollo L., Porciatti V., Pizzorusso T., Maffei L. Heterozygous knock-out mice for brain-derived neurotrophic factor show a pathway-specific impairment of long-term potentiation but normal critical period for monocular deprivation. *J Neurosci*. 2002; 22(23): 10072-77.

67. Vilar M., Mira H. Regulation of Neurogenesis by Neurotrophins during Adulthood: Expected and Unexpected Roles. *Front Neurosci*. 2016; 10: 26-35.

68. Nakagawara A., Azar C.G., Scavarda N.J., Brodeur G.M. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol*. 1994; 14(1): 759-67.

69. Lessmann V., Gottmann K., Malsangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol*. 2003; 69(5): 341-74.

70. Goldberg J.L., Barres B.A. The relationship between neuronal survival and regeneration. *Annu. Rev. Neurosci*. 2000; 23: 579-612.

71. Liu Q.R., Lu L., Zhu X.G., Gong J.P., Shaham Y., Uhl G.R. Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice

variants, and regulation by cocaine. *Brain Res*. 2006; 1067(1): 1-12.

72. Jiang Q., Yan Z., Feng J. Neurotrophic factors stabilize microtubules and protect against rotenone toxicity on dopaminergic neurons. *J Biol Chem*. 2006; 281(39): 29391-400.

73. Battiston B., Papalia I., Tos P., Geuna S. Chapter 1: Peripheral nerve repair and regeneration research: a historical note. *Int. Rev. Neurobiol*. 2009; 87: 1-7.

74. Gu X. Progress and perspectives of neural tissue engineering. *Front Med*. 2015; 9: 401-11.

75. Karagayur M., Dyikanov D., Makarevich P., Semina E., Stambolsky D., Plekhanova O., Kalinina N., Tkachuk V. Non-viral transfer of BDNF and uPA stimulates peripheral nerve regeneration. *Biomed Pharmacother*. 2015; 74: 63-70.

76. Zhang J.Y., Luo X.G., Xian C.J., Liu Z.H. & Zhou X.F. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *Eur J Neurosci*. 2000; 12: 4171-80.

77. Namgung U. The role of Schwann cell-axon interaction in peripheral nerve regeneration. *Cells Tissues Organs*. 2014; 200: 6-12.

78. Stoll G., Griffin J.W., Li C.Y., Trapp B.D. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol*. 1989; 18: 671-83.

79. Frostick S.P., Yin Q., Kemp G.J. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*. 1998; 18: 397-405.

80. Gu X., Ding F., Yang Y. & Liu J. Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. *Prog Neurobiol*. 2011; 93: 204-30.

81. Chan J.R., Watkins T.A., Cosgaya J.M., Zhang C., Chen L., Reichardt L.F., Shooter EM, Barres BA. NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. *Neuron*. 2004; 43: 183-91.

82. Kingham P.J., Kolar M.K., Novikova L.N., Novikov L.N., Wiberg M. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells Dev*. 2014; 23(7): 741-754.

83. Lopatina T., Kalinina N., Karagayur M., Stambolsky D., Rubina K., Revischin A., Pavlova G., Parfyonova Y., Tkachuk V. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PLoS One*. 2011; 6(3): e17899-e17909.

84. Lu B., Nagappan G., Guan X., Nathan PJ, Wren P. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2013; 14: 401-16.

85. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat*. 1999; 194(1): 1-14.

86. Gordon T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurg Focus*. 2009; 26(2): E3-E13.

87. Budni J., Belletini-Santos T., Mina F., Garcez M.L., Zugno A.I. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging Dis*. 2015; 6(5): 331-41.

88. Mitchell A.C. Neuroprotection by physical activity. *Vanderbilt Reviews. Neurosci*. 2010; 7: 76-81.

89. Gordon Boyd J., Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Molecular Neurobiology*. 2003; 27(3): 277-323.

Сведения об авторах:

Стамбольский Д.В., *Stambolsky D.V.*, <https://orcid.org/0000-0001-6983-9697>

Плеханова Ольга Сергеевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова, e-mail: plekhanova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4693-295X>

Юдина Ирина Юрьевна, канд. мед. наук, доцент, Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова ИПО каф. клинической фармакологии и фармакотерапии, e-mail: ikozlovskaya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4138-6371>

Калинина Наталья Игоревна, канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотр., ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова, e-mail: n_i_kalinina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3497-9619>

Карагяур Максим Николаевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., Медицинский научно-образовательный центр МГУ им. М.В. Ломоносова, e-mail: darth_max@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4289-3428>

Дубров Вадим Эрикович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. общей и специализированной хирургии, ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова, e-mail: vduort@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5929-8225>

Кочиш Александр Юрьевич, доктор мед. наук, проф., зам. директора по научной и учебной работе, Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена Минздрава России, e-mail: auk1959@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2466-7120>

Семина Екатерина Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., ФГБУ РКНПК Минздрава России, e-mail: e-semina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3927-9286>

Акопян Жанна Алексеевна, канд. мед. наук, зам. директора по развитию, Медицинский научно-образовательный центр МГУ им. М.В. Ломоносова, e-mail: zhanna.fbm@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0989-7825>

Голубев Игорь Олегович, доктор мед. наук, проф., зав. отд-нием микрохирургии и травмы кисти, Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, e-mail: iog305@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1291-5094>

Антонов Алексей Витальевич, канд. мед. наук, ординатор нейрохирургического отд., ГБУЗ РКБ им. Г.Г. Куватова, e-mail: alexey.antonov68@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7385-5331>

Сафин Шамиль Махматович, доктор мед. наук, проф., гл. внештатный нейрохирург МЗ РБ, руководитель центра специализированного вида мед. помощи-нейрохирургия, ГБУЗ РКБ им. Г. Г. Куватова, e-mail: safinsh@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0100-6100>

Ткачук Всеволод Арсеньевич, доктор биол. наук, акад. РАН, проф., декан факультета фундаментальной медицины, ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова, руководитель отдела биохимии ФГБУ РКНПК Минздрава России, e-mail: tkachuk@fbm.msu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7492-747X>

К 95-летию академика АМН СССР и РАМН Г.Н. Крыжановского

11 ноября 2017 года исполнилось 95 лет со дня рождения выдающегося ученого патофизиолога и крупного организатора медико-биологической науки Георгия Николаевича Крыжановского — академика АМН СССР и РАМН, лауреата государственной премии СССР, Заслуженного деятеля науки РФ, доктора медицинских наук, профессора, Президента Российского научного общества патофизиологов, Президента Российского общества по изучению боли, Основателя и Почетного президента Международного общества по патофизиологии.



лемой — изучением патогенеза столбняка и механизмов действия столбнячного токсина. Этой проблеме были посвящены его многолетние исследования, в которых ему принципиально по-новому удалось определить природу сложного патогенеза столбняка как полисистемного заболевания, при котором в патологический процесс вовлекаются разные интегративные системы и органы. Эти исследования были обобщены в кандидатской и докторской диссертациях Георгия Николаевича Крыжановского, а также в монографии «Столбняк, патогенез, лечение» (1966).

Вся творческая жизнь Георгия Николаевича была тесно связана с Институтом общей патологии и патофизиологии, в котором он проработал 67 лет, пройдя путь от аспиранта до директора Института. Г.Н. Крыжановский стал преемником выдающихся ученых — академиков А.Д. Сперанского, В.Н. Черниговского, В.В. Парина и академика АМН СССР А.М. Чернуха.

Несмотря на смену названий института в разные периоды жизни нашей страны, институт сохранил слабые научные традиции и особую атмосферу научного творчества до настоящего времени. И в этом большая заслуга Георгия Николаевича Крыжановского, который до последних своих дней следовал высказыванию великого Пастера «Il faut travailler, il faut travailler, il faut travailler» («Надо работать, надо работать, надо работать») и работал до конца своих дней.

Георгий Николаевич пришел в институт, можно сказать, прямо после Парада Победы, в котором ему посчастливилось принять участие. Он всю свою жизнь хранил Благодарность за участие в Параде Победы, подписанную Верховным Главнокомандующим Вооруженных сил СССР И.В. Сталиным. Г.Н. Крыжановский был награжден медалью «За победу над Германией в Великой Отечественной войне 1941—1945 гг.».

После окончания Великой Отечественной войны Георгий Николаевич стал одним из первых аспирантов института и под руководством академика А.Д. Сперанского занимался важной для медицины проб-

Итоги этой многолетней работы были лишь «трамплином» для анализа фундаментальных закономерностей патологии нервной системы. Георгием Николаевичем Крыжановским была разработана теория генераторных, детерминантных и системных механизмов нейропатологических синдромов, введено представление о патологической системе как патобиологической основе и патофизиологическом механизме развития патологических процессов и возникновения нейропатологических синдромов в различных сферах деятельности нервной системы. Нейропатологические синдромы являются клиническим выражением деятельности лежащих в их основе патологических систем. На основе теории генераторных и системных механизмов было создано более 20 моделей нейропатологических синдромов, относящихся к разным сферам деятельности ЦНС — сенсорной, двигательной, эмоциональной, высшей нервной деятельности, поведения и нервно-психических расстройств. За эти исследования Георгию Николаевичу Крыжановскому была присуждена Государственная премия СССР. Георгий Николаевич прекрасно понимал, что моделирование патологических процессов и различных заболеваний является мощнейшим оружием патофизиологии и, пожалуй, ее единственным собственным методом, поскольку патофизиологи используют в основном методы смежных дисциплин.

Дальнейшим обобщением теории генераторных и системных механизмов нейропатологических синдромов стало развитие представлений о патологических

интеграциях как о новых, не существующих в физиологических условиях, патодинамических организациях, состоящих из первично и вторично измененных структур ЦНС. Формирование гомо- и гетерологических интеграций является общей закономерностью патологии.

На основе теоретических разработок Г.Н. Крыжановский предложил принцип *комплексной патогенетической терапии* нейропатологических синдромов. Он заключается в сочетанном воздействии соответствующих лечебных средств на комплекс патологических систем (патологическую интеграцию) и на различные звенья патологической системы, а если последняя имеет выход на периферию, то и на измененный орган-мишень, который является конечным звеном патологической системы нервно-соматического расстройства. Георгий Николаевич подчеркивал, что сами по себе лечебные воздействия далеко не всегда ликвидируют болезнь. Большое значение имеет активация естественных саногенетических механизмов. На основе общебиологического принципа антагонистических отношений в регуляции функций Г.Н. Крыжановский предложил понятие *антисистемы*, предупреждающей формирование или гиперактивацию патологической системы и имеющей значение естественного саногенетического механизма, противодействующего патологической системе и участвующей в ее ликвидации.

Георгий Николаевич Крыжановский сформулировал общую теорию *дисрегуляторной патологии*, которая стала новым научным направлением в системе медико-биологических наук. На долгие годы эта проблема стала основным направлением исследований Института общей патологии и патофизиологии.

Георгий Николаевич Крыжановский являлся президентом Российского научного общества по изучению боли. Он был одним из первых исследователей, кто ввел понятие «*патологическая боль*» и создал первую и единственную в стране лабораторию патофизиологии боли. Патологическая боль, которая, в отличие от физиологической боли, не является защитным сигнальным механизмом, вызывает дезадаптацию организма, нарушает его деятельность, вызывает психоэмоциональные расстройства и повреждение внутренних органов. Патологическая боль является, по существу, *дисрегуляторной болезнью*.

В последние годы жизни Георгий Николаевич Крыжановский сформулировал *новые определения основных категорий общей патологии*, таких как здоровье, болезнь, выздоровление, динамический гомеостаз.

Научные достижения Г.Н. Крыжановского были бы невозможны без работы творческого коллектива сотрудников и мощной работоспособной лаборатории

общей патологии нервной системы. В организации работы лаборатории ярко проявились его качества как научного руководителя, способного собрать талантливых сотрудников и сплотить их в единый сильный коллектив. К Георгию Николаевичу всегда тянулись молодые биологи и врачи, в его кабинете всегда кипели страстные научные споры, под его руководством защищались кандидатские и докторские диссертации.

Георгий Николаевич создал большую научную школу, главным направлением работы которой являются проблемы общей патологии, общей патофизиологии и патофизиологии нервной системы. К школе Г.Н. Крыжановского принадлежит множество специалистов различного профиля: патофизиологов, невропатологов, психиатров, нейробиологов. Многие его ученики стали известными учеными, руководителями научных центров, кафедр, лабораторий. Они работают в различных городах России, Украины, Белоруссии, в Узбекистане, Азербайджане, Армении, Молдавии.

Важным этапом для понимания и определения места патофизиологии на современном этапе явилось создание Международного общества по патофизиологии (International Society for Pathophysiology), Учредительный конгресс которого проходил в Москве в июне 1991 года. В период подготовки конгресса выкристаллизовалось положение о патофизиологии как интегративной науке, определено место патофизиологии как теоретической основы медицины, моста между базисными научными дисциплинами и клинической медициной. Тогда же проблема патологии регуляции была впервые сформулирована как общая идейная основа Конгресса. Под руководством Г.Н. Крыжановского Институт общей патологии и патологической физиологии АМН СССР стал организационной базой подготовки и проведения Первого Учредительного Международного конгресса по патофизиологии. Президентом Конгресса и первым Президентом созданного на Конгрессе Международного общества по патофизиологии заслуженно стал Георгий Николаевич. Попытки создать такое общество предпринимались и ранее. Однако это удалось только благодаря научному авторитету, энергии, организаторским способностям и оптимизму Георгия Николаевича, поэтому на 2-м Международном Конгрессе в Киото (1994 г.) ему было присвоено звание «Основатель и Почетный Президент Международного общества по патофизиологии». Насколько известно, это первый в СССР и России случай присвоения такого звания международным обществом. Георгий Николаевич Крыжановский совместно с японскими коллегами организовал Международный журнал «Pathophysiology», первый номер (1994) которого открылся

проблемной статьёй Г.Н. Крыжановского «Modern Pathophysiology».

Георгий Николаевич Крыжановский проводил огромную научно-организационную работу. На протяжении 10 лет он был академиком-секретарем Отделения медико-биологических наук и членом Президиума АМН СССР и РАМН, а затем советником Президиума РАМН. Более 50 лет Георгий Николаевич принимал участие в руководстве ведущим медико-биологическим журналом нашей страны — «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», сначала в качестве ответственного секретаря, затем — заместителя главного редактора. На протяжении двух последних десятилетий своей жизни академик Г.Н. Крыжановский являлся Президентом Всесоюзного, ныне Российского научного общества патофизиологов. За это время было проведено ряд съездов и конгрессов общества. Георгий Николаевич являлся членом редколлегии научно-практического журнала «Патологическая физиология и экспериментальная терапия» и ряда других, в том числе международных журналов.

Георгий Николаевич представлял собой тип директора — научного руководителя. Его эрудиция и

энциклопедические знания, стремление к внедрению новейших достижений в работу сотрудников позволяли ему успешно, на протяжении многих лет, руководить Институтом, в котором традиционно разрабатывалось множество проблем. И эта традиция сохраняется в настоящее время. Впервые в нашей стране Георгий Николаевич основал новое направление — нейроиммунопатологию и организовал в институте одноименную лабораторию. Под его председательством было проведено шесть Российских конференций по нейроиммунопатологии.

До конца своих дней Георгий Николаевич жил научными идеями, которые всегда были неожиданны и оригинальны.

Георгий Николаевич Крыжановский был удостоен высшей награды Российской академии медицинских наук — премии и медали Н.И. Пирогова. Его весомый вклад в науку отмечен орденами СССР — Орденом «Дружбы народов» и Орденом «Знак Почета».

Н.А.Крупина, Т.В.Давыдова

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-002

Фомочкина И.И.¹, Ломакин Н.В.², Зыков К.А.³, Бурячковская Л.И.⁴, Кубышкин А.В.¹

Новое в молекулярных механизмах воспаления (Информация о XIII Всемирном Конгрессе по воспалению)

¹ Медицинская академия им. С.И. Георгиевского Крымского федерального университета, Симферополь

² ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» УДП РФ, Москва

³ Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва

⁴ Российский кардиологический научно-производственный комплекс им. Мясникова, Москва

С 8 по 12 июля 2017 г. в Лондоне (Великобритания) проходил XIII Всемирный Конгресс, посвященный проблеме воспаления (The 13th World Congress on Inflammation), — одно из крупнейших событий в мировой медицине, на который регулярно съезжаются ученые и ведущие специалисты со всего мира. В этом году Конгресс собрал около 300 участников из 41 страны — специалистов в различных областях медицины, которых объединил научный интерес к проблемам воспаления. Организуемый каждые 2 года на протяжении многих лет Конгресс стал хорошей традицией и представляет собой ключевую возможность обмена профессиональными знаниями и результатами проведенных исследований, направленных на решение общей задачи — раскрытие патогенеза и улучшение контроля над воспалительными заболеваниями.

Научная программа XIII Всемирного Конгресса была насыщена новой, ценной для специалистов информацией и позволила лекторам представить актуальные результаты исследований, полученных учеными в лучших лабораториях мира и Европы. В настоящее время благодаря усилиям исследователей ведется огромная работа по консолидации медицинского научного и клинического сообщества и достижению главной цели: расшифровке ключевых воспалительных механизмов с акцентом на изучение механизмов старения, канцерогенеза и поиску эффективных терапевтических целей для таргетной противовоспалительной терапии. Конгресс был традиционно интересен и полезен как сформировавшимся титулованным ученым, так и молодым исследователям, которым следует рассматривать такие форумы в качестве трамплина для дальнейшего развития международных коллабораций и научного роста.

От имени организаторов Конгресса-2017, Британской ассоциации исследований воспаления, и Международной ассоциации обществ воспаления, к участникам с приветственной речью обратился профессор Ian Adcock (Imperial College London, UK) — известный ученый в области молекулярной биологии, который возглавляет исследовательскую группу в Национальном институте сердца и легких Имперского колледжа Лондона [1]. Он отметил, что в пленарных докладах представлены результаты исследований-лидеров в своих областях, и подчеркнул, что на Конгрессе удалось организовать интенсивное

взаимодействие участников, представляющих разные области науки, и услышать «пионеров» академического сообщества. Ian Adcock также призвал ученых из разных стран мира и Европы становиться активными участниками национальных ассоциаций исследований воспаления.

Основные научные темы, которые поднимались на пленарных заседаниях и симпозиумах, были посвящены вопросам молекулярных механизмов воспаления и включали различные аспекты изучения нейровоспаления, Т-клеточного иммунитета, врожденной иммунологической памяти, микробиомы, аутофагии и иммунорегуляции, а также патогенетические взаимосвязи между канцерогенезом, метаболическими нарушениями и воспалением [2].

Научную часть пленарных заседаний своим докладом «Старение и воспаление» открыла профессор Janet Lord (Birmingham University, UK), молекулярный биолог, Директор института Воспаления и старения Университета Бирмингема, которая посвятила лекцию ведущей роли воспаления в развитии основных хронических заболеваний и старения. Сообщение касалось в первую очередь атеросклероза и его осложнений, артериальной гипертензии, сахарного диабета 2 типа, метаболического синдрома, хронических неспецифических заболеваний легких, болезни Альцгеймера. Профессор J. Lord отметила, что одной из причин воспаления при столь различной, на первый взгляд, но ассоциированной с возрастом патологии, является старение иммунной системы, проявляющееся в снижении миграционной способности нейтрофилов, базальной активации моноцитов, которые поддерживают хроническое низкоинтенсивное воспаление [3, 4]. Среди причин хронического воспаления, способствующего неблагоприятному варианту старения, были названы: накопление окисленных липопротеидов низкой плотности, перегрузка эндоплазматического ретикулама, курение, инфекции и интоксикации, а также недостаток физической активности и накопление источника провоспалительных медиаторов — стареющих клеток. Интенсивность воспалительного процесса и его исходы, помимо эпигенетических влияний, зависят также от генетических особенностей организма, в том числе от полиморфизма множества генов, участвующих в его инициации и развитии.

Еще один знаковый доклад представил профессор Adrian Hayday (Imperial College London, UK), член Академии наук и Королевского общества. В сообщении были рассмотрены основные механизмы, используемые эпителиальными $\gamma\delta$ Т-клетками для поддержания гомеостаза и облегчения процессов регенерации, а также определен принцип возникновения молекулярных взаимодействий между $\gamma\delta$ - и эпителиальными клетками. В результате многолетних исследований, выполненных группой ученых под его руководством, было доказано, что $\gamma\delta$ Т-клетки играют решающую роль в гомеостазе, восстановлении тканей, воспалении и защите от злокачественных новообразований [5]. В некоторых тканях $\gamma\delta$ Т-клетки являются единственной постоянной популяцией Т-лимфоцитов, тогда как в других они сосуществуют с $\alpha\beta$ -клетками и другими популяциями. В докладе было отмечено, что функция $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в эпителии требует постоянной связи между клетками, и эти взаимодействия координируются специфическими цитокинами, хемокинами, факторами роста, которые оказывают специализированное воздействие на соседние эпителиальные клетки.

Вопросам нейровоспаления была посвящена пленарная лекция Michal Schwartz (The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel), профессора нейроиммунологии, чьи исследования сосредоточены на роли врожденного и адаптивного иммунитета в пластичности центральной нервной системы, а также посвящены разработке методологии модулирования функции иммунной системой в интересах ЦНС при острых травмах, хронических нейродегенеративных состояниях и старении головного мозга [6]. Профессор M. Schwartz предложила новое понимание роли микроглии в патогенезе болезни Альцгеймера, обосновала концепцию «защитного аутоиммунитета», оценила роль Т-клеток для здоровой функциональной пластичности мозга, представила сведения о наличии разрешающего «иммунологического интерфейса» между мозгом и кровообращением и обосновала факт, что старение головного мозга и нейродегенеративные заболевания могут быть связаны с дисфункцией этого интерфейса, а также привела доказательства правомочности применения таргетной иммунотерапии при лечении нейродегенеративных заболеваний [7].

Особый интерес среди исследователей вызвала лекция профессора Luke O'Neill (School of Biochemistry and Immunology, Trinity College Dublin, Ireland), посвященная возможностям метаболического перепрограммирования при воспалении. Сфера его научных интересов относится к области молекулярных механизмов воспалительных заболеваний с фокусом в отношении Toll-подобных рецепторов, а также метаболическому контролю над провоспалительными сигналами. В 2016 г. агентством Thompson Reuters профессор L.O'Neill был назван одним из самых влиятельных ученых в мире в области как иммунологии,

так и фармакологии/токсикологии, благодаря исследованиям по разработке антимедиаторных лекарственных препаратов. Пленарная лекция L.O'Neill на Конгрессе была анонсом NLRP3 инфламмосомы в качестве новой терапевтической мишени при различных воспалительных заболеваниях — от остеоартрита до нейродегенеративных заболеваний, таких, как болезнь Паркинсона и Альцгеймера. Работа над NLRP3 инфламмосомой и IL-1 β стала частью исследований проблемы иммунометаболизма, которая переживает возрождение в последние годы [8, 9]. Кроме того, профессор L.O'Neill в своем сообщении остановился на роли метаболитов цикла Кребса в качестве таргетной терапии воспаления. Так, было обнаружено, что метаболиты цикла Кребса, такие, как сукцинат, рассматриваются в качестве провоспалительной сигнальной молекулы, повышаются при ревматоидном артрите в синовиальной жидкости и действуют через рецептор SUCRN1 на макрофагах, стимулируя продукцию провоспалительных цитокинов, таких, как IL-1 β . Эти идеи дают новое представление об обмене веществ, иммунитете и воспалении и могут указывать на новые перспективные терапевтические подходы.

Завершающим аккордом торжества науки в Лондоне, которое продолжалось 5 дней, стала лекция профессора Peter Barnes, президента Конгресса Воспаление, — британского ученого, признанного самым цитируемым исследователем патологии дыхательных путей в мире за последние 20 лет, и который в настоящее время возглавляет направление респираторной медицины в Имперском колледже Лондона. Доклад P. Barnes был посвящен концепции здорового старения, как процессу поддержания функциональной способности, обеспечивающей благополучие в пожилом и старческом возрасте. В его сообщении обсуждались роль и значение хронического низкоинтенсивного воспаления в патогенезе значимой патологии пожилого возраста, а также прозвучал призыв к созданию оптимального подхода к феномену старения населения, который требует коренного изменения системы здравоохранения, а также предоставления комплексной помощи, сосредоточенной на потребностях пожилых людей [10]. По мнению ученого, жизнь и функционирование современного общества поднимают фундаментальные вопросы о понятии здоровья в пожилом возрасте, возможностях его определения и поддержания. Были также представлены объединенные европейские рекомендации по антиэйджинг-профилактике и терапии, особенностью которых стал акцент на популяционных подходах.

Интерес гостей Конгресса вызвали не только пленарные заседания, но и секционные доклады, который в этом году были представлены в виде Симпозиумов различных стран-участников, среди которых следует отметить Японию, Россию, США, Канаду, Австралию, Италию и Бразилию и т.д.

Более подробно следует остановиться на одном из Симпозиумов — «Интегративные механизмы воспаления» Российского «Национального научного общества «Воспаление» (<http://www.inflammation.ru/>), который состоялся 12 июля и привлек внимание большого числа специалистов по вопросам воспаления из разных стран. Симпозиум был посвящен общим проблемам развития воспаления и интегративным механизмам, которые лежат в основе развития воспаления. В частности, в представленных докладах были приведены данные о взаимодействии иммунологических механизмов при развитии воспаления, роли регуляторных воспалительных механизмов в развитии системных типических патологических процессов, феномену синдрома системной воспалительной реакции и ее роли при шоковых состояниях. Среди докладов на Симпозиуме следует отметить сообщение профессора Зыкова Кирилла Алексеевича, заведующего лабораторией пульмонологии НИМСИ Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова, члена Российского и Европейского респираторного обществ и Американского торакального общества, который в своем докладе сообщил о создании и разработке нового метода оценки активности β 1- и β 2-адренорецепторов на поверхности клеток млекопитающих, основанного на радиолигандном анализе, позволяющим применять его в условиях реальной клинической практики [11].

Внимание ученых привлек доклад, который стал результирующей многолетних исследований, выполненных коллективом кафедры общей и клинической патофизиологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского под руководством профессора Кубышкина Анатолия Владимировича, который представляла на Конгрессе профессор Фомочкина И.И. В сообщении рассматривались вопросы локальных и системных реакций при критических состояниях, была представлена оценка возможности использования показателей неспецифической протеиназ-ингибиторной системы в качестве маркеров развития критических состояний [12, 13]. Также в докладе подтверждалась общность альтернативных механизмов, изменений в протеиназ-ингибиторной системе, микроциркуляторных нарушений при развитии синдрома системной воспалительной реакции и при шоке. Авторами была предложена новая классификация шоковых состояний, которая объединила концепции шока и синдрома системной воспалительной реакции.

В ходе Симпозиума «Интегративные механизмы воспаления» была анонсирована конференция Европейского сообщества «Воспаление», проведение которой запланировано на осень 2018 в г. Москве. Как ожидается, ее проведение привлечет внимание ведущих ученых, клини-

ческих специалистов, экспертов и представителей фармацевтической промышленности, которые задействованы в разработке новых методов лечения.

В рамках Конгресса прошло награждение молодых ученых, совершивших наиболее значимые исследования, а также награждение премией «Women in Science» за вклад в современную науку.

По традиции по окончании конгресса с приветственной речью выступили организаторы следующего, уже XIV Всемирного Конгресса Воспаления, который состоится в сентябре 2019 г. в Сиднее, Австралия.

References

1. Langley G.R., Adcock I.M., Busquet F. et al. Towards a 21st-century roadmap for biomedical research and drug discovery: consensus report and recommendations. *Drug Discov Today*. 2017 Feb; 22(2): 327-39.
2. 13th World Congress on Inflammation July 8 — 12, London, UK. 2017.
3. Bartlett D.B., Shepherd S.O., Lord J.M. et al. Neutrophil and Monocyte Bactericidal Responses to 10 Weeks of Low-Volume High-Intensity Interval or Moderate-Intensity Continuous Training in Sedentary Adults. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017: 8148742.
4. Wilson D., Jackson T., Sapey E., Lord J.M. Frailty and sarcopenia: The potential role of an aged immune system. *Ageing Res Rev*. 2017 Jul; 36:1-10.
5. Schmolka N., Wencker M., Hayday A.C., Silva-Santos B. Epigenetic and transcriptional regulation of $\gamma\delta$ T cell differentiation: Programming cells for responses in time and space. *Semin Immunol*. 2015 Feb; 27(1): 19-25.
6. Schwartz M., Deczkowska A. Neurological Disease as a Failure of Brain-Immune Crosstalk: The Multiple Faces of Neuroinflammation. *Trends Immunol*. 2016 Oct; 37(10): 668-79.
7. Schwartz M. Can immunotherapy treat neurodegeneration? *Science*. 2017 Jul 21; 357(6348): 254-55.
8. Kim R.Y., Pinkerton J.W., Essilfie A.T. et al. Role for NLRP3 Inflammasome-mediated, IL-1 β -dependent Responses in Severe, Steroid-resistant Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Mar 2; doi: 10.1164/rccm.201609-1830OC. [Epub ahead of print]
9. O'Neill L.A., Kishton R.J., Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol*. 2016 Sep; 16(9): 553-65.
10. Barnes P.J. Mechanisms of development of multimorbidity in the elderly. *Eur Respir J*. 2015 Mar; 45(3): 790-806.
11. Kostyukevich M.V., Zikov K.A., Mironova N.A. et al. [Role of Autoantibodies Against 1-Adrenergic Receptor in Cardiovascular Disease]. *Kardiologiya*. 2016 Dec; 56(12): 82-91.
12. Kubyshekin A.V., Aliev L.L., Fomochkina I.I. et al. Endometrial hyperplasia-related inflammation: its role in the development and progression of endometrial hyperplasia. *Inflamm Res*. 2016 Oct; 65(10): 785-94.
13. Fomochkina I., Kubyshekin A., Kharchenko V., Fedosov M., Pisarev A., Beketov A. *Inflammation and shock: interaction of sirs and other complications // 13th World Congress on inflammation (London, UK, 8-12 July 2017)*. 2017.