

**ПОЧТОВЫЙ АДРЕС:**

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

Редакция журнала  
«Патологическая физиология  
и экспериментальная терапия».  
Home page: www.jppt.net  
E-mail: path.physiol@yandex.ru

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

ЛР №010215 от 29.04.97.

Издатель: ООО «Гениус Медиа»  
E-mail: genius-media@mail.ru

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

**ИФ РИНЦ 0,600**

**Журнал включен в базу данных Scopus**

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

Подписной индекс  
по каталогу агентства «Роспечать»:  
**71456**

Сдано в набор 11.06.2015 г.  
Подписано в печать 09.07.2015 г.

ISSN 0031-2991

Пат. физиол. и Экспер. тер.  
2015. Том 59. №2. 1–132.

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.

Тираж 300 экз.

© ООО Издательство «Гениус Медиа», 2015.

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 59, № 2, 2015**  
**Апрель—июнь**

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

**Главный редактор Б.Б. Мороз**

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

## Редационный совет

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

125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

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

ЛР №010215 от 29.04.97.

Издатель: ООО «Гениус Медиа»  
E-mail: genius-media@mail.ru

ИФРИНЦ 0,600

ISSN 0031-2991  
Pathological  
physiology  
and experimental  
therapy  
2015. Vol. 59. №2. 1–132.

THE INSTITUTE OF GENERAL PATHOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY

---

# PATHOLOGICAL PHYSIOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPY

---

*Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*

*Quarterly reviewed science and practical journal  
Published since 1957*

Vol. 59, № 2, 2015

April—June

**Editor in chief** B.B. Moroz

**Assistant editors in chief:**

I.S. Gushchin, V.K. Reshetnyak

**Executive editor, scientific editor:** N.S. Gourko

**Members of editorial board:**

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

**Staff**

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

Moscow

© ООО «Гениус Медиа», 2015.

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Григорьян А.С., Орлов А.А., Сабурин И.Н., Зурина И.М., Сысоев С.Д.* Динамика остеогенетического процесса, вызванного инокуляцией аутологичных стромальных клеток, выделенных из жировой ткани крысы (экспериментально-морфологическое исследование) . . . . . 4
- Аврущенко М.Ш., Острова И.В., Заржецкий Ю.В., Мороз В.В., Гудашева Т.А., Середенин С.Б.* Влияние миметика фактора роста нервов ГК-2 на постреанимационную экспрессию нейротрофических факторов. . . . . 12
- Кметь Т.И., Ткачук С.С.* Динамика изменений морфофункционального состояния p53-положительных клеток коры височной доли полушарий головного мозга крыс под влиянием каротидной ишемии-реперфузии . . . . . 19
- Баранов М.В., Ковалев А.С., Перфилов Д.В., Черногоров Р.В., Репенкова Л.Г.* Влияние моделированной микрогравитации на порог болевой чувствительности у человека при однократном приеме кеторолака . . . . . 23
- Зарубина И.В., Федорова О.В., Шабанов П.Д.* Анализ эффектов тропалгина при воспалительной боли у крыс с различным болевым порогом . . . . . 29
- Долгих В.Т., Епифанов В.Г.* Фибрилляция предсердий и состояние вегетативной нервной системы: особенности тактики и оказания медицинской помощи на догоспитальном этапе . . . . . 34
- Буренкова О.В., Александрова Е.А., Зарайская И.Ю.* Эффект блокатора гистоновых деацетилаз вальпроата натрия на постнатальное развитие мышей линии 129SV . . . . . 40
- Порядин Г.В., Власов А.П., Анаскин С.Г., Власова Т.И., Потянова И.В., Турыгина С.А.* Системные факторы прогрессирования острого панкреатита . . . . . 46
- Будылина С.М., Дмитриева Л.А., Костина Н.В., Георгиева О.А., Перцов С.С.* Вкусовое восприятие при клиническом симптомокомплексе гастроэзофагеальной рефлюксной болезни . . . . . 51
- Коненков В.И., Борodin Ю.И., Макарова О.П., Бгатова Н.П., Рачковская Л.Н.* Эффекты наноразмерных частиц карбоната лития на оксидантно-антиоксидантный статус опухолевой ткани при развитии гепатокарциномы-29 . . . . . 57
- Митчиев А.К.* Изменение активности перекисного окисления липидов как механизм развития патологии почек при действии тяжелых металлов . . . . . 65
- Дзугкоев С.Г., Можаяева И.В., Отиев М.А., Маргиева О.И., Дзугкоева Ф.С.* Влияние L-карнитина, афобазола и их комбинации с L-аргинином на биохимические и гистологические показатели дисфункции эндотелия при кобальтовой интоксикации у крыс . . . . . 70

### ОБЗОРЫ

- Усова Е.В., Копанцева М.Р., Егоров В.И., Копанцев Е.П., Сverdlov Е.Д.* Белки SNAI1 и SNAI2 – транскрипционные мастер-регуляторы эпителиально-мезенхимального перехода . . . . . 76
- Зорин В.Л., Зорина А.И., Пулин А.А., Копнин П.Б., Еремин И.И.* Перспективы использования клеток, обладающих миогенным потенциалом, в лечении заболеваний скелетных мышц: обзор исследований. Ч. 1. Сателлитные клетки . . . . . 88
- Малышев И.Ю.* Феномены и сигнальные механизмы репрограммирования макрофагов . . . . . 99
- Романова Г.А., Шакова Ф.М., Парфёнов А.Л.* Моделирование черепно-мозговой травмы. . . . . 112

### МЕТОДИКА

- Тезиков Е.Б., Литвицкий П.Ф.* Электрофизиологические признаки синдрома отмены этанола на изолированном перфузируемом мозге крыс . . . . . 116

### ХРОНИКА

- Кубышкин А.В., Навасардян Г.А., Гусакова С.В., Орлов С.Н., Григорьян А.С., Коваленко Е.П.* Патопатология как мост между медицинской теорией и практикой (информация о VII Конгрессе Международного общества патофизиологов) . . . . . 123

## CONTENTS

### ORIGINAL ARTICLES

- Grigoryan A.S., Orlov A.A., Saburina I.N., Zurina I.M., Sysoev S.D.* Dynamics of osteogenesis associated with inoculation of autologous stromal cells from rat adipose tissue (experimental-morphological study) . . . . . 4
- Avrushchenko M.Sh., Ostrova I.V., Zarzhetsky Yu.V., Moroz V.V., Gudasheva T.A., Seredenin S.B.* Effect of the nerve growth factor mimetic GK-2 on post-resuscitation expression of neurotrophic factors . . . . . 12
- Kmet T.I., Tkachuk S.S.* Dynamics of changes of p53-positive cells morphofunctional condition in the cerebral cortex of the temporal lobe in rats affected by carotid ischemia-reperfusion . . . . . 19
- Baranov M.V., Kovalev A.S., Perfilov D.F., Chernogorov R.V., Repenkova L.G.* Influence of simulated microgravity on the threshold of pain sensitivity in humans with single dose of ketorolac . . . . . 23
- Zarubina I.V., Fedorova O.V., Shabanov P.D.* Analysis of tropalgin effects in an inflammation pain model in rats with different pain threshold . . . . . 29
- Dolgikh V.T., Epifanov V.G.* Atrial fibrillation and condition of vegetative nervous system: features of tactics and medical aid rendering at the pre-hospital stage . . . . . 34
- Burenkova O.V., Aleksandrova E.A., Zarayskaya I.Yu.* Effects of histone deacetylase inhibitor sodium valproate on the physical and behavioral development of 129SV mice . . . . . 40
- Poryadin G.V., Vlasov A.P., Anasskin S.G., Vlasova T.I., Potynova I.V., Turigina S.A.* Systemic factors of acute pancreatitis advance . . . . . 46
- Budylnina S.M., Dmitrieva L.A., Kostina N.V., Georgieva O.A., Pertsov S.S.* Taste perception during clinical symptom complex of gastroesophageal reflux disease . . . . . 51
- Konenkov V.I., Borodin Yu. I., Makarova O.P., Bgatova N.P., Rachkovskaya L.N.* Effects of lithium carbonate nanosized particles on oxidant-antioxidant status in tumor tissue of hepatocarcinoma-29 . . . . . 57
- Mitsiev A.K.* Change lipid peroxidation as a mechanism of renal disease under heavy metals . . . . . 65
- Dzugkoev S.G., Mozhaeva I.V., Otiev M.A., Margieva O.I., Dzugkoeva F.S.* Effect of L-carnitine, afobazole and their combination with l-arginine on biochemical and histological indices of endothelial disfunction in cobalt intoxication in rats . . . . . 70

### REVIEWS

- Usova E.V., Kopantseva M.R., Egorov V.I., Kopantzev E.P., Sverdlov E.D.* SNAI1 and SNAI2 – transcriptional master-regulators of epithelial-mesenchymal transition . . . . . 76
- Zorin V.L., Zorina A.I., Pulin A.A., Kopnin P.B., Eremin I.I.* Prospects for the use of cells possessing myogenic potential in the treatment of skeletal muscle diseases: a review of research. Part 1 – Satellite cells . . . . . 88
- Malyshev I.Yu.* Phenomena and signaling mechanisms of macrophage reprogramming . . . . . 99
- Romanova G.A., Shakova F.M., Parphenov A.L.* Modeling of traumatic brain injury . . . . . 112

### METHODS

- Tezиков Е.Б., Litvickiy P.F.* Electrophysiological features (EEG) of ethanol withdrawal syndromes on isolated perfused rat brain . . . . . 116

### CHRONICLE

- Kubyshkin A.V., Navasardian G.A., Gusakova S.V., Orlov S.N., Grigorian A.S., Kovalenko E.P.* Pathophysiology as a bridge between medical theory and practice (Information about VII Congress of International Society of Pathophysiologists) . . . . . 123

© Коллектив авторов, 2015  
УДК 616-092.4

Григорьян А.С.<sup>1</sup>, Орлов А.А.<sup>2</sup>, Сабурин И.Н.<sup>2,3</sup>, Зурина И.М.<sup>2</sup>, Сысоев С.Д.<sup>2</sup>

## **Динамика остеогенетического процесса, вызванного инокуляцией аутологичных стромальных клеток, выделенных из жировой ткани крысы (экспериментально-морфологическое исследование)**

<sup>1</sup> — ФГБУ Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Минздрава России, 119991, Москва, ул. Тимур Фрунзе, 16

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

<sup>3</sup> — ГБОУ ДПО Российская Медицинская Академия Последипломного образования Минздрава России, 123995, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

Исследование выполнено на 40 самцах крыс Вистар. На экспериментальной модели повреждения нижней челюсти костный аутографт из большеберцовой кости помещали на поверхность нижнечелюстной кости (материнская кость). 20 крысам основной группы в пространство между ними инокулировали аутологичные стромальные клетки из подкожной жировой ткани (СКЖТ). В группе сравнения использовали ту же экспериментальную модель без введения клеток. В основной группе между костным аутографтом и материнской костью наблюдали интенсивное новообразование фиброретикулярных костных структур, которые, в последующем, претерпевали вторичную перестройку и дифференцировку в процессе ремоделирования. В результате проведенного исследования установлено, что в основной группе к 180-м сут. происходило значимое снижение площади, занимаемой прежде гиперплазированным фиброретикулярным костным веществом. Описанный феномен, по-видимому, можно объяснить падением числа активных клеток в популяции инокулированных СКЖТ, которые, согласно концепции Хейфлика—Мурхеда, имеют предел числа делений за счет укорочения теломер.

**Ключевые слова:** стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ), костный аутографт, индукция остеогенеза, гиперплазия костной ткани, эффект Хейфлика—Мурхеда

Grigoryan A.S.<sup>1</sup>, Orlov A.A.<sup>2</sup>, Saburina I.N.<sup>2,3</sup>, Zurina I.M.<sup>2</sup>, Sysoev S.D.<sup>2</sup>

## **Dynamics of osteogenesis associated with inoculation of autologous stromal cells from rat adipose tissue (experimental-morphological study)**

<sup>1</sup> — FSBI Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery, Ministry of Health of the Russian Federation, 16, Timura Frunze st., 119991, Moscow, Russia

<sup>2</sup> — FSBSI «Institute of general pathology and pathophysiology», 8, Baltiyskaya st., 125315, Moscow, Russia

<sup>3</sup> — Russian Medical Academy of Postgraduate Education, 2/1, Barrikadnaya st., 123995, Moscow, Russia

Experiment was evaluated on 40 male Wistar rats. On the experimental model of mandible injury, bone autologous graft from tibia was placed on the surface of mandible (host bone). In the main experimental group, consisting of 20 animals, autologous rat adipose-derived stromal cells (ADSCs) were inoculated in space between autograph and host bones. ADSCs were not inoculated in the group of comparison. In experimental group with inoculated cells, the formation of a new fibroreticular bone structures in space between autograph and host bone was observed. These structures further underwent secondary reorganization and differentiation during the process of remodeling. As a result of the conducted study it was shown that in the experimental group by the day 180, statistically significant reduction of the area occupied by an immature fibroreticular bone took place. The reported phenomenon could be explained as a result of decline of the number of active cells in the population of inoculated ADSC, which is in consent with theory of limited cell division number due to telomeres shortening, described by Hayflick L. and Moorhead P.S. (1961).

**Key words:** adipose-derived stromal cells (ADSCs), bone autograft, osteogenesis induction, bone tissue hyperplasia, Hayflick—Moorhead effect

**Для корреспонденции:** Григорьян Алексей Суренович, д.м.н., проф., консультант отдела общей патологии ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава России

В настоящее время клеточные технологии рассматриваются как наиболее перспективные для применения в регенеративной медицине.

Мультитипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) рассматривают как основной источник клеток для обновления и регенерации костной ткани. Значительную роль в развитии этого направления исследований сыграли работы Caplan с соавторами, продемонстрировавшие образование ectopических очагов костеобразования и значительное ускорение заживления обширных костных дефектов при трансплантации кальций-фосфатной керамики, комбинированной с ММСК костного мозга [1]. В настоящее время еще одним более доступным источником ММСК является подкожная жировая ткань, содержащая стволовые и прогениторные клетки [2].

**Цель исследования** — изучение остеогенной эффективности аутологичных стромальных клеток из подкожной жировой ткани (СКЖТ) на различных сроках после их инокуляции. Для этого планировалось выявить, используя гистоморфологический метод, конкретные процессы жизненного цикла костной ткани, подверженные тем или иным изменениям под влиянием СКЖТ, а также оценка длительности остеостимулирующего эффекта аутологичных СКЖТ, инокулированных в пространство между костным аутотрансплантатом и материнской костью (нижняя челюсть) подопытных животных.

## Методика

### *Выделение стромальных клеток жировой ткани крыс (СКЖТ)*

Клетки стромально-сосудистой фракции выделяли у 20 крыс по стандартному протоколу из ткани подкожного жира [3, 4]. Для этого, под общей анестезией (кетамин, 8 мг/100 г) рассекали кожу, отделяли гиподерму от мышц брюшной стенки, отрезали фрагмент подкожного жира, кожу зашивали. Извлеченный фрагмент жира помещали в стерильный транспортный контейнер в среду DMEM/F12 (Биолот) с добавлением глутамина (2 mM L, Биолот) и гентамицина (50 мкг/мл, ПанЭко). Полученные образцы ткани отмывали от сгустков крови и волосяного покрова в растворе Хенкса (Биолот), содержащем антибиотики (1% пенициллин-стрептомицин, 400 ед/мл гентамицин, ПанЭко). Образцы ткани механически измельчали и ферментативно обрабатывали в растворе коллагеназы I типа (0,07%, ПанЭко) и диспазы (0,025%, ПанЭко) в течение 25 мин. После окончания инкубации в раствор с ферментами и ткань добавляли полную ростовую среду и центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об/мин. Полученный осадок ресуспендировали

в полной среде и пропускали через нейлоновый фильтр, чтобы избавиться от крупных фрагментов ткани. Выделенные клетки вместе с ферментированными кусочками тканей помещали на чашки Петри (60 мм) в полную ростовую среду.

### *Культивирование СКЖТ*

Культивировали клетки в стандартных условиях (37°C; 5% CO<sub>2</sub>) в полной ростовой среде, состоящей из смеси базовых сред DMEM/F-12 (1:1, Биолот), дополненной 2 mM L-глутамина, 100 ед/мл антибиотика (гентамицин, ПанЭко) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone). Замену среды производили каждые 2 сут. Когда клетки достигали монослоя, осуществляли пересев культуры на новые чашки Петри (90 мм) с помощью раствора версена (Биолот) и 0,25%-ного раствора трипсина (Биолот). После четвертого пассажа культивирования в монослое СКЖТ трансплантировали экспериментальным животным.

### *Проточная цитофлуориметрия*

Для анализа экспрессии основных поверхностных маркеров на клетках использовали метод проточной цитофлуориметрии. Данный метод основан на реакции антиген-антитело, при этом антитело конъюгировано с флуорохромом, что позволяет визуализировать и оценить экспрессию искомого белка качественно и количественно. В итоге таким образом можно определить количество клеток, относящихся к той или иной субпопуляции. С помощью 0,25% раствора трипсина и раствора версена получали суспензии диссоциированных клеток после первого и четвертого пассажа и инкубировали их с антителами к CD11b, CD14, CD19, CD29, CD31, CD45, CD90, CD105 и CD133 (Beckman Coulter). Полученные материалы анализировали на проточном цитофлуориметре FC500 (Beckman Coulter, США) с помощью программы CXP System. Количество МСК на 1 введение на крысу составляло 3,5—6,7 × 10<sup>6</sup> в 0,4 мл физиологического раствора.

### *Хирургические операции*

Эксперимент был проведен на 40 самцах крыс Вистар, массой 200—220 г. Животных разделили на 2 равные группы: основную группу, животным которой в пространство между костным аутотрансплантатом (фрагмент большеберцовой кости) и материнской костью (нижняя челюсть) инокулировали СКЖТ, и группу сравнения, в которой животным не вводили клетки. Хирургическое вмешательство проводили в 2 этапа.



*Первый хирургический этап* — забор ауто трансплантата из правой большеберцовой кости (tibia). Анестезию осуществляли при введении кетамина и ксилазина (1:1 по объему в одном шприце) из расчета 0,15 мл препарата на 100 г веса животного. После действия наркоза проводили разрез по передней поверхности голени от дистальной части симфиза коленного сустава над большеберцовой костью длиной 1,5 см. Рассекали футлярно-надкостничную перемычку верхней трети tibia. Скелетировали участок кости 2 x 2 мм фрезой (с охлаждением физиологическим раствором) на глубину 1,5 мм. Выпиливали участок кости (ауто трансплантат). Костный дефект в tibia пломбировали хирургическим воском BONEWAX (Ethicon, США), после чего рану ушивали материалом Викрил 5,0.

Полученный ауто трансплантат помещали в стерильный физиологический раствор. По ходу всей операции осуществляли гемостаз.

*Второй хирургический этап* — пересадка свободного ауто трансплантата tibia на наружную поверхность тела и ветви нижней челюсти и фиксация его титановым микровинтом (L = 5 мм, D = 1,2 мм).

Производили разрез кожи и подкожно-жировой клетчатки по краю тела нижней челюсти, раздвигая мышцы и сосуды, осуществляли доступ к поверхности тела и ветви нижней челюсти. Кость скелетировали, производили остеотомию площадью 3 x 3 мм. Создавали перфорационное отверстие в кости нижней челюсти и в ауто трансплантате (с охлаждением физиологическим раствором). Ауто трансплантат фиксировали титановым винтом, после чего рану ушивали материалом Викрил 5,0. Антибиотик Байтрил 5% по 0,1 мл вводили внутримышечно дважды после операции из расчета на 10 мг/кг веса животного.

Основной группе животных дважды вводили суспензию СКЖТ: первое введение — инъекция в область операции в день операции; второе введение — на 10-е сут. после операции. Область хирургического вмешательства обкалывали в четырех точках. Количество клеток на каждое введение составляло 3,5—6,7 x 10<sup>6</sup> клеток в 0,4 мл физиологического раствора на животное.

#### *Гистологическое исследование*

Животных выводили из эксперимента на 21-е, 60-е, 120-е и 180-е сут. после операции. Каждый костный блок, включающий костный ауто трансплантат и фрагмент материнской кости, декальцинировали в 25%-ном Трилоне Б и заливали в парафин. Срезы толщиной 8 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином, либо пикрофуксином по Ван-Гизону с докрасиванием ядер железным гематоксилином по Вейгерту.

Для исследования и статистического анализа отбирали каждый 10-й срез. Таким образом, расстояние между исследуемыми срезами составляло порядка 50 мкм. Для каждой временной точки наблюдения (21-е, 60-е, 120-е, 180-е сут.) исследовали 20 срезов. Такой дизайн морфометрического исследования обеспечил репрезентативность полученного материала по группам и срокам экспериментов, позволил выявить с высокой степенью значимости корреляции между инокуляцией СКЖТ в область хирургического вмешательства и морфологическими проявлениями эффектов от введения СКЖТ. Полученные данные послужили основанием для заключения об остеогенном эффекте инокуляции аутологических СКЖТ в пространство между костным трансплантатом и материнской костью.

Проводили сопоставление интенсивности новообразования костного вещества (фиброретикулярная кость) в основной группе и группе сравнения.

#### *Гистоморфометрическое исследование*

Гистоморфометрический анализ проводили в соответствии с рекомендациями Автандилова Г.Г. (2002). На гистологических препаратах определяли долю площади в процентах, занимаемую следующими тканевыми структурами:

- 1) вновь образованное костное вещество — фиброретикулярная костная ткань;
- 2) зрелая пластинчатая костная ткань;
- 3) фиброзная или клеточно-волоконистая соединительная ткань.

Выбор перечисленных типов тканевых структур определялся следующими соображениями: во-первых, изучение динамики образования фиброретикулярной костной ткани позволяло количественно определить остеогенетическую активность введенных в область экспериментального воздействия СКЖТ; с другой стороны, по показателям интенсивности новообразования костного вещества в различные сроки эксперимента мы полагали возможным судить о длительности сохранения в области экспериментального воздействия инокулированных клеток.

В процессе анализа статистических показателей были произведены процедуры, позволившие, используя метод формализации, получить массивы числовых показателей, в качестве которых выступали процентные показатели — доли площади, занимаемой каждым из трех типов тканевых структур, избранных в качестве критерийных признаков. При сопоставлении полученных величин за их значимое различие принимали  $t \leq 0,001$

Все статистические процедуры производили в аппарате программы Excel 2003 по критерию «Стьюдента». Статистическую значимость различий или вероят-

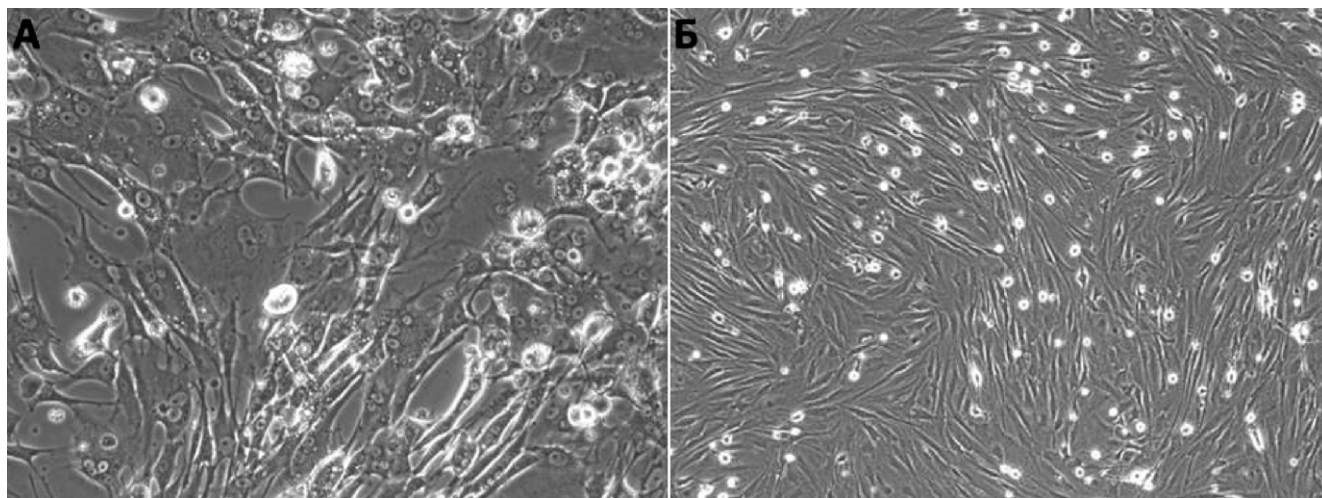


Рис. 1. Культура мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани. А — пассаж 1, прикрепление клеток к субстрату и активная миграция из ферментированной ткани; Б — пассаж 4, монослойная культура, клетки имеют мезенхимный фенотип. Фазово-контрастная световая микроскопия.

ность принадлежности к различным числовым массивам (или наоборот) определяли с помощью t-теста (Т-ТЕСТ) в пакете статистических исследований Excel 2003. Во всех случаях статистические значения характеризовались нормальным распределением.

### Результаты и обсуждение

На сегодняшний день стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ) являются уникальным источником мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, сопоставимых с клетками костного мозга, которые можно выделить в результате малоинвазивной операции независимо от возраста и пола животных. Сами клетки представляют собой аутологичную быстро пролиферирующую гомогенную фракцию и спо-

собны дифференцироваться в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях. Наши результаты показали, что первичная культура клеток содержала крупные стромальные клетки и адипоциты, несущие жировые капли (рис. 1, А). После пересевов к четвертому passages культура состояла из быстро размножающихся прогениторных клеток, которые имели морфологию мезенхимных клеток — соотношение ядра к цитоплазме около 1, тело клетки фибробластоподобное (рис. 1, Б).

Изменения иммунофенотипического профиля культуры СКЖТ от первого до четвертого пассажа приведены в табл. 1. Значительные изменения в экспрессии поверхностных маркеров отмечены жирным шрифтом и демонстрируют принадлежность культуры четвертого пассажа к мультипотентным мезенхимным

Таблица 1

Иммунофенотипический анализ культур СКЖТ 1-го и 4-го пассажей

Анализируемые маркеры	Уровень экспрессии		Клетки-мишени, экспрессирующие данный маркер
	Пассаж 1	Пассаж 4	
Isotype IgG	0,109%	0,523%	Автофлуоресценция
CD11b-	0,215%	5,743%	Лейкоциты
CD14-	0,640%	2,439%	Моноциты
CD19-	2,310%	5,702%	В-лимфоциты
CD34-	5,529%	4,384%	Эндотелиальные клетки
CD45-	0,022%	0,111%	Лейкоциты
CD133-	0,013%	0,354%	Эндотелиальные клетки
CD29+	99,775%	95,330%	ММСК
CD90+	29,719%	98,907%	ММСК
CD105+	87,763%	93,423%	ММСК

Значения статистических показателей, характеризующих вес долей площадей (%) трех типов тканевых структур: незрелая ретикулофиброзная костная ткань, зрелая (пластинчатая) костная ткань и соединительная ткань

Группы эксперимента	Сроки экспериментальных наблюдений (сутки)			
	21	60	120	180
Основная группа				
Незрелая ретикулофиброзная костная ткань	50,2 ± 7,1	58,1 ± 2,9	55,1 ± 3,8	23,1 ± 10,2
Зрелая (пластинчатая) костная ткань	27,3 ± 6,3	23,7 ± 8,5	48,2 ± 5,1	41,4 ± 13,6
Соединительная ткань	28,3 ± 7,8	19,3 ± 5,1	2,5 ± 2,1	2,5 ± 2,1
Группа сравнения				
Незрелая ретикулофиброзная костная ткань	40,2 ± 4,9	1,4 ± 1,3	0,1 ± 0,3	1,8 ± 2,7
Зрелая (пластинчатая) костная ткань	38,3 ± 6,3	34,6 ± 7,3	49,9 ± 8,1	39,9 ± 7,3
Соединительная ткань	35,7 ± 7,8	55,2 ± 4,1	55,1 ± 6,2	62,7 ± 16,1

стромальным клеткам (ММСК), а именно — положительная экспрессия маркеров CD105+/CD90+/CD29+. Таким образом, культура, которую использовали для дальнейших исследований, обладала всеми свойствами культуры ММСК: клетки были адгезивны к пластику, обладали способностью формировать быстро пролиферирующие плотные колонии, экспрессировали характерные поверхностные маркеры: CD105+/CD90+/CD29+, и не экспрессировали маркеры клеток гемопоэтического ряда: CD45-/CD11b-/CD34-.

По результатам гистоморфометрического исследования анализ динамики изменения показателей долей площади, занимаемой фиброретикулярной костной тканью, зрелой пластинчатой костной тканью и фиброзной (клеточно-волоконистой) соединительной тканью, показал, что в пространстве между аутотрансплантатом и материнской костью (нижняя челюсть) и в них самих развиваются процессы, которые с высокой степенью достоверности можно рассматривать как эффект воздействия СКЖТ (статистические показатели по всем группам наблюдений представлены в табл. 2).

Так, на ранних сроках эксперимента (21-е и 60-е сут.) в указанной области наблюдали интенсивное формирование фиброретикулярной костной ткани (рис. 2, 3; табл. 2). При этом активный остеогенез протекал как в основной группе, так и в группе сравнения. Однако в основной группе опыта площадь, занимаемая фиброретикулярной костной тканью, была статистически значимо больше, чем в группе сравнения ( $t \leq 0,001$ ) (рис. 2). Относительно высокая интенсивность костеобразования, отмеченная у животных группы сравнения на 21-е сут. была обусловлена непосредственной и естественной регенераторной реакцией костной ткани на травматическое воздействие. При этом она была значительно менее выраженной, чем у животных основной группы. В основной группе, начиная с 21-х сут., наблюдали стабильно высокие значения этого показателя, которые сохранялись вплоть до 120-х сут. опыта (рис. 3, А).

Однако к 180-м сут. площади, занятые незрелыми костными структурами фиброретикулярного типа, резко сокращались ( $t \leq 0,001$ ) (рис. 2). При этом костная ткань аутотрансплантата, прежде гиперплазированная под влиянием активных СКЖТ, к 180 сут. подвергалась частичной, иногда очень выраженной резорбции (рис. 3, Б), в ней нарастал удельный вес полей фиброзной и клеточно-волоконистой соединительной ткани ( $t \leq 0,001$ ).

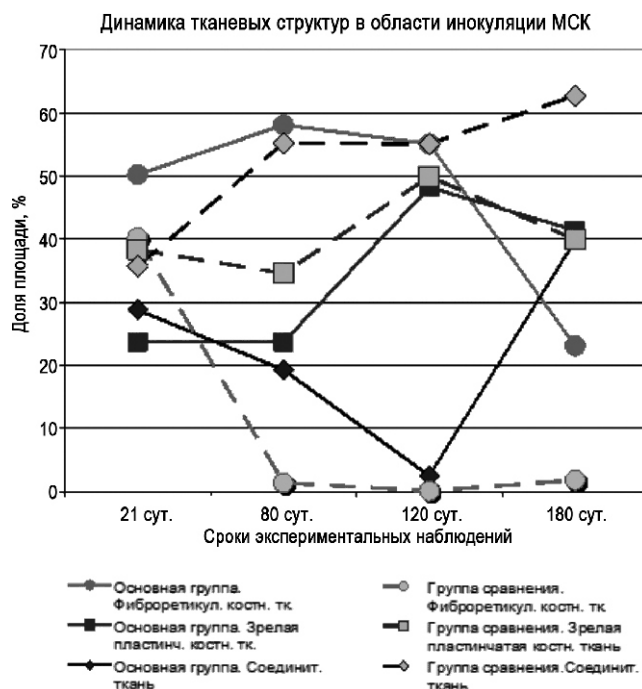


Рис. 2. Статистические показатели, отражающие динамику изменения площади 3 типов тканевых структур: фиброретикулярной костной ткани, зрелой пластинчатой костной ткани, соединительной ткани.



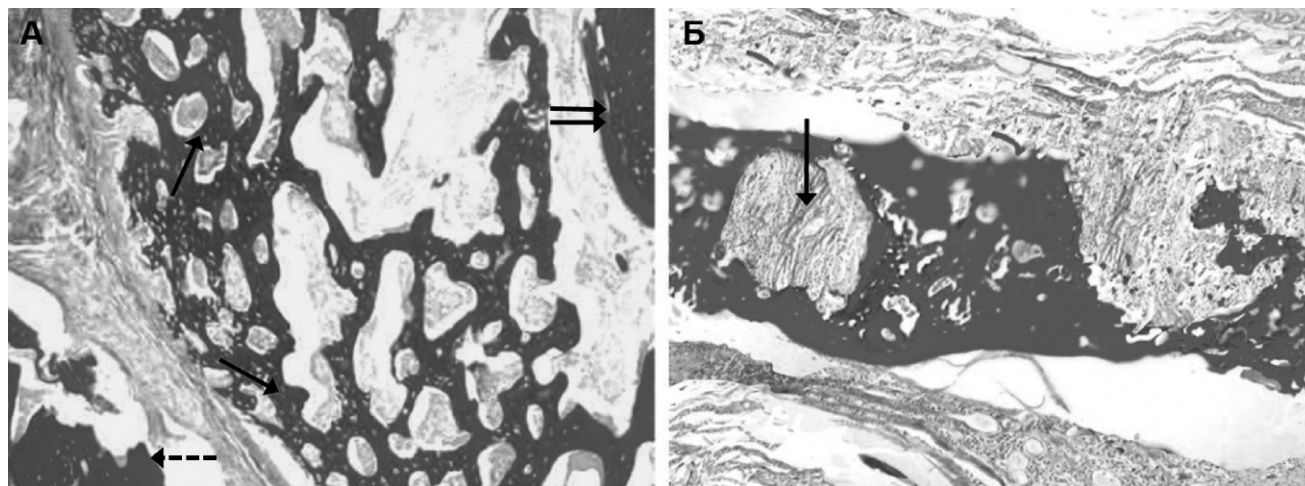


Рис. 3. А — основная группа, 21 сут. наблюдений. Интенсивное новообразование фиброретикулярной костной ткани (сплошные одиночные стрелки) в пространстве между костным аутотрансплантатом (пунктирная стрелка) и материнской костью (сдвоенные стрелки). Окрашивание гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 2,5$ . Б — основная группа, 180 сут. наблюдений. Выраженные проявления резорбции в прежде гиперплазированной костной ткани, располагавшейся в пространстве между аутокостным трансплантатом и материнской костью. В обширных резорбционных полостях располагается фиброзная соединительная ткань (стрелка). Окрашивание гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 50$ .

Что касается зрелой пластинчатой кости, имеющей остеонное строение, то в сроки 120 сут. и 180 сут. ее показатели значимо нарастают относительно 60 сут. ( $t \leq 0,001$ ).

В группе сравнения на всех сроках наблюдения между костным аутотрансплантатом и материнской костью располагалась широкая зона фиброзной соединительной ткани (рис. 4).

Таким образом, судя по динамике изменения долей площадей, занимаемых тремя различными типами тканевых структур в пространстве между аутотрансплантатом и материнской костью, куда в основной группе экспериментов инокулировали аутологичные стромальные клетки, полученные из жировой ткани (СКЖТ), происходила индукция образования нового костного вещества, особенно выраженная в сроки 21-е — 60-е сут. Об этом, в частности, свидетельствует статистически значимое превышение интенсивности новообразования костного вещества в основной группе относительно этого показателя в группе сравнения. Интенсивность костеобразования в группе сравнения была относительно высокой лишь на 21-е сут., что можно объяснить непосредственной и естественной репарационной реакцией собственных остеогенетических элементов костной ткани. И, тем не менее, в основной группе показатели остеогенетической активности на 21-е сут. были значимо выше, чем в группе сравнения (табл. 2, рис. 2).

В целом, в области инокуляции СКЖТ происходили сложные взаимосвязанные процессы, отражающие как остеогенетический потенциал инокулированных клеток, так и особенности их характеристик, в частности, очевидную гетерогенность этой клеточ-

ной популяции по продолжительности жизни. Это в значительной мере соответствует концепции Хейфлика—Мурхеда, которые постулировали гетерогенность популяций стволовых клеток, связанную с нарастанием числа дефектных репликаций, сопровождающихся одновременно сокращением на концах хромосом длины теломер, чем обусловлены процессы старения, в том числе стволовых клеток [6].

Можно предположить, что пул СКЖТ в отдаленные сроки (после 120 сут.) при отсутствии его пополнения извне истощался в результате созревания определенной части этих клеток (здесь и далее см.

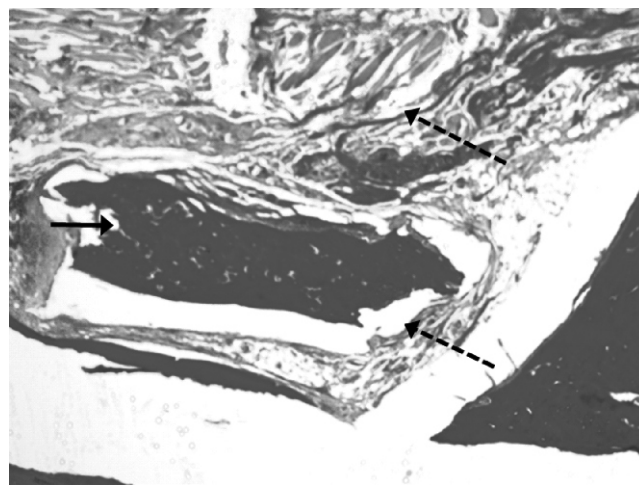


Рис. 4. Группа сравнения, 60 сут. опыта. Костный аутотрансплантат, имеющий изъеденные края (сплошная стрелка), окружен широкой зоной фиброзной соединительной ткани (пунктирные стрелки). Признаки остеогенеза отсутствуют. Окрашивание гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 2,5$ .

рис. 2). О правильности такой гипотезы свидетельствовало также значимое возрастание к 120 и 180 сут., по сравнению с 60 сутками, доли зрелой пластинчатой кости ( $t \leq 0,001$ ). Можно предположить, что в процессе ремоделирования происходило истощение пула введенных в пространство между материнской костью и аутоотрансплантатом СКЖТ и прекращение после 120-х сут. (к 180-м сут.) эффекта индукции остеогенеза, вызванной введенными клетками. В литературе описываются и обсуждаются отдельные звенья механизмов, регулирующих процесс ограничения числа клеточных делений за счет укорочения теломер [7]. Это явление связывают с отсутствием теломеразной активности на концах хромосом теломерах, в результате чего часть клеток по мере осуществления митозов выпадает из циклов репликации ДНК [7]. Такие же эффекты можно наблюдать в митохондриальных ДНК, что обуславливает активацию механизмов апоптоза в клетках [8].

Заслуживает внимания динамика изменения показателей долей площадей, занимаемых в группах наблюдений соединительной тканью. На рис. 2 видно резкое возрастание удельного веса площадей, занятых соединительной тканью в основной группе на 180-е сут опыта. Такая динамика отражает процессы резорбции костного вещества с замещением его соединительной тканью, что наблюдалось на значительных по протяженности участках аутоотрансплантата на сроке 180-е сут. ( $t \leq 0,001$ ). На гистологических препаратах этому процессу соответствовали выраженные картины деградации костного вещества, что выражалось образованием обширных резорбционных дефектов в костных блоках (рис. 3, Б).

В основной группе, где в область экспериментального воздействия вводили СКЖТ, до 120-х сут. опыта площади, занимаемые соединительной тканью, были минимальными, и, напротив, в группе сравнения, где клетки не вводили, наблюдали значительно большие доли площади, занимаемой фиброзной либо клеточно-волокнистой тканью (рис. 2, 4).

Такое преобладание соединительнотканых структур объясняется, вероятно, дефицитом трофического обеспечения, обусловленном конкурентностью между тканевыми структурами с разным уровнем специализации [9]. Так, в группе сравнения наблюдали неровность краев костного аутоотрансплантата, а также дегенерацию и декомпозицию пристеночно расположенных клеток и снижение их числа (рис. 4). Эти изменения свидетельствуют о том, что использованная экспериментальная модель по условиям трофического обеспечения аутоотрансплантата не являлась оптимальной, что и привело к возникновению описанных структурных проявлений альтерации в костном аутоотрансплантате как в группе сравнения, так и при пре-

кращении индуцирующего остеогенез воздействия активных СКЖТ при истощении их пула в основной группе к 180-м сут. опыта.

### Заключение

Таким образом, можно заключить, что одним из клинически важных эффектов введения СКЖТ являлось заполнение пространства между костным аутоотрансплантатом и материнской костью новообразованной костной тканью, которая закономерно претерпевает вторичную перестройку и дифференцировку в процессе ремоделирования. В эти физиологические процессы вовлекаются и СКЖТ, введенные в пространство между материнской костью и аутоотрансплантатом.

Интенсивность образования костного вещества *de novo* (фибро-ретикулярная кость), его значимое возрастание по сравнению со второй экспериментальной группой полностью отражает остеогенетический потенциал инокулированных клеток.

Вместе с тем, после 120-х сут. (к 180-м сут.) наблюдали значимое снижение площади, занимаемой фиброретикулярной костной тканью при одновременном значительном возрастании площади зрелой пластинчатой костной ткани (рис. 3). Этот феномен, на наш взгляд, можно объяснить снижением числа активных клеток в популяции инокулированных СКЖТ, которая не пополюлась из-за ограниченного числа делений клеток, в результате чего происходило постепенное истощение популяции активных остеогенных предшественников.

Интерпретация полученных нами данных совпадает с концепцией Hayflick, Moorhead (1961) и Heidinger с соавторами (2012), находящая сегодня все большее число сторонников [7, 10]. Эта концепция постулирует существование механизма, ограничивающего число делений клеток из-за отсутствия активной теломеразы. Указанный механизм играет важную роль в стабилизации процесса смены клеточных генераций, обуславливает «старение» клеточных популяций, а также препятствует иммортализации клеток и, соответственно, появлению злокачественных новообразований.

### Список литературы

1. Ohgushi H., Goldberg V.M., Caplan A.I. Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 1989; 7(4): 568-78.
2. Bunnell B.A., Flaatt M., Gagliardi C., Patel B., Ripoll C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008; V. 45: 115-20.
3. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J.I., Futrell W.J., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell based therapies. *Tissue Eng*. 2001; V. 7: 211-26.

4. Dubois S.G., Floyd E.Z., Zvonic S., Kilroy G., Wu X., Carling S., Halvorsen Y.D., Ravussin E., Gimble J.M. Isolation of human adipose-derived stem cells from biopsies and liposuction specimen. *Methods Mol. Biol.* 2008; V. 449:69-79.

5. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии. М.: Медицина; 2002.

6. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961; 25(3):585-621.

7. Signer R.A.J., Morrison S.J. Mechanisms that regulate stem cell aging and life span. *Cell Stem Cell.* 2013; 12(2): 152-65.

8. Seruya M., Shah A., Pedrotty D., du Laney T., Melgiri R., McKee J.A., Young H.E., Niklason L.E. Clonal population of adult stem cells: life span and differentiation potential. *Cell Transplant.* 2004; 13(2):93-101.

9. Sethe S., Scutt A., Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing research reviews.* 2006; 5(1): 91-116.

10. Heidinger B.J., Blount J.D., Boner W., Griffiths K., Metcalfe N.B., Monaghan P. Telomere length in early life predicts lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; V. 109:1743-8.

Поступила 05.05.15.

### References

1. Ohgushi H., Goldberg V.M., Caplan A.I. Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *Journal of Orthopaedic Research.* 1989; 7(4): 568-78.

2. Bunnell B.A., Flaat M., Gagliardi C., Patel B., Ripoll C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods.* 2008; V. 45: 115-20.

3. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J.I., Futrell W.J., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell based therapies. *Tissue Eng.* 2001; V. 7: 211-26.

4. Dubois S.G., Floyd E.Z., Zvonic S., Kilroy G., Wu X., Carling S., Halvorsen Y.D., Ravussin E., Gimble J.M. Isolation of human adipose-derived stem cells from biopsies and liposuction specimens. *Methods Mol. Biol.* 2008; V. 449: 69-79.

5. Автандилов Г.Г. Basics of quantitative pathological anatomy. Moscow; Medicina, 2002. (in Russian)

6. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961; 25(3): 585-621.

7. Signer R.A.J., Morrison S.J. Mechanisms that regulate stem cell aging and life span. *Cell Stem Cell.* 2013; 12(2): 152-65.

8. Seruya M., Shah A., Pedrotty D., du Laney T., Melgiri R., McKee J.A., Young H.E., Niklason L.E. Clonal population of adult stem cells: life span and differentiation potential. *Cell Transplant.* 2004;13(2): 93-101.

9. Sethe S., Scutt A., Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing research reviews.* 2006; 5(1): 91-116.

10. Heidinger B.J., Blount J.D., Boner W., Griffiths K., Metcalfe N.B., Monaghan P. Telomere length in early life predicts lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; V. 109: 1743-8.

Received 05.05.15

### Сведения об авторах:

Орлов Андрей Алексеевич, д.м.н., гл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Сабурова Ирина Николаевна, д.биол.н., зав. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»; проф. каф. общей патологии и патофизиологии ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России

Зурина Ирина Михайловна, науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Сысоев Сергей Дмитриевич, науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»



Аврущенко М.Ш.<sup>1</sup>, Острова И.В.<sup>1</sup>, Заржецкий Ю.В.<sup>1</sup>,  
Мороз В.В.<sup>1</sup>, Гудашева Т.А.<sup>2</sup>, Середенин С.Б.<sup>2</sup>

## Влияние миметика фактора роста нервов ГК-2 на постреанимационную экспрессию нейротрофических факторов

<sup>1</sup> — ФГБНУ НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского РАН, 107031, Москва, ул. Петровка, д.25, стр. 2

<sup>2</sup> — ФГБНУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

**Цель работы** — оценка влияния миметика фактора роста нервов ГК-2 на уровень экспрессии нейротрофических факторов и процесс гибели нейронов в постреанимационном периоде после остановки сердца у крыс. **Методика.** У половозрелых белых крыс-самцов вызывали остановку сердца на 12 минут с последующей реанимацией. 10 крысам вводили ГК-2 (1 мг/кг в/б) через 30 мин и 48 ч после оживления. 10 нелеченых животных в те же сроки получали эквивалентные дозы физиологического раствора. Контролем служили ложноперированные крысы ( $n = 10$ ). На 7-е сутки постреанимационного периода методом морфометрического анализа определяли плотность высокочувствительной к гипоксии популяции клеток Пуркинье мозжечка. Иммуногистохимическое исследование экспрессии белков FGFb, NT4, BDNF проводили непрямым пероксидазно-антипероксидазным методом с использованием первичных поликлональных антител. Определяли число нейронов с разным уровнем экспрессии изучаемых нейротрофических факторов. **Результаты и обсуждение.** В постреанимационном периоде у нелеченых животных была выявлена гибель нейронов, которой подвергались NT4-негативные, FGFb-негативные и BDNF-негативные клетки. ГК-2 не влиял на уровень экспрессии FGFb и NT4, однако способствовал увеличению уровня экспрессии BDNF. Иницируя экспрессию BDNF в клетках, ранее не вырабатывающих этот фактор, ГК-2 предупреждал развитие постреанимационной гибели нейронов. Полученные в работе факты позволяют заключить, что одним из механизмов нейропротективного действия миметика фактора роста нервов ГК-2 является его способность активизировать экспрессию BDNF в нервных клетках.

**Ключевые слова:** миметик фактора роста нервов ГК-2; постреанимационный период; гибель нейронов; NT4; BDNF; FGFb; клетки Пуркинье мозжечка

Avrushchenko M.Sh.<sup>1</sup>, Ostrova I.V.<sup>1</sup>, Zarzhetsky Yu.V.<sup>1</sup>,  
Moroz V.V.<sup>1</sup>, Gudasheva T.A.<sup>2</sup>, Seredenin S.B.<sup>2</sup>

## Effect of the nerve growth factor mimetic GK-2 on post-resuscitation expression of neurotrophic factors

<sup>1</sup> — V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, 107031 Moscow, Petrovka str., 25, bld.2

<sup>2</sup> — V.V. Zakusov Research Institute of Pharmacology, 125315 Moscow, Baltiyskaya str., 8.

**The objective:** to elucidate an influence of nerve growth factor mimetic GK-2 on the expression of neurotrophic factors and the process of neuronal death after ischemia-reperfusion. **Materials and methods.** Adult white male rats underwent cardiac arrest for 12 minutes, followed by resuscitation. 10 rats were injected GK-2 (1 mg/kg i/p) at 30 minutes and 48 hours after resuscitation. 10 untreated animals received equivalent doses of saline. The control group consisted of sham-operated animals ( $n = 10$ ). On the 7th postoperative day the total density of hypoxia-sensitive cerebellar Purkinje cells was determined by morphometric analysis. Immunohistochemical study of proteins FGFb, NT4, BDNF was performed by indirect peroxidase-antiperoxidase method using primary polyclonal antibodies. The number of neurons with different expression levels of the neurotrophic factors was determined. **Results.** In the post-resuscitation period the neuronal loss was detected in untreated animals. Namely NT4-negative, FGFb-negative and BDNF-negative cells died. GK-2 had no effect on the expression level of FGFb and NT4, however, promoted an increase in the expression level of BDNF. Initiating the expression of BDNF in neurons that were not previously producing this factor, GK-2 prevents the development of post-resuscitation neuronal death. Obtained facts lead to the conclusion that one of the mechanisms of neuroprotective action of nerve growth factor mimetic GK-2 is its ability to activate the expression of BDNF in nerve cells.

**Key words:** nerve growth factor mimetic GK-2; post-resuscitation period; neuronal loss; NT4; BDNF; FGFb; Purkinje cells of the cerebellum

**Для корреспонденции:** Аврущенко Мария Шапсаевна, д.биол.н., вед. науч. сотр. лаб. патологии клетки при критических состояниях ФГБНУ «НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского», e-mail: maria\_avr@mail.ru



Фактор роста нервов (nerve growth factor — NGF) является представителем семейства нейротрофинов — белков, принимающих участие в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки нейронов, в поддержании их биохимического и морфологического фенотипа, а также в процессах распознавания и формирования памяти [1, 2]. Известно, что NGF участвует в защите мозга при ишемии [3—6]. Вместе с тем, NGF обладает слабой способностью проникать через гематоэнцефалический барьер, а также серьезными побочными эффектами, основные из которых гипералгезия и катастрофическая потеря веса. Это обусловило необходимость разработки системно-активных низкомолекулярных миметиков NGF, которые воспроизводили бы его терапевтические эффекты, не обладая побочным действием. В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова был синтезирован димерный дипептидный миметик 4-й петли NGF, получивший шифр ГК-2 [7]. ГК-2 малотоксичен и лишен основных побочных эффектов NGF [8, 9]. Показана способность ГК-2 *in vitro* защищать нейроны при окислительном стрессе, воздействии глутамата и нейротоксинов [10], а также *in vivo* при моделировании болезни Паркинсона [11]. Выявлены положительные эффекты применения ГК-2 и при очаговой ишемии мозга [12, 13]. Установлено, что нейропротективная активность ГК-2 связана с активацией TrkA рецепторов и Akt-сигнального пути [8]. Ранее нами были получены прямые доказательства нейропротективного действия ГК-2 в постреанимационном периоде после временной остановки сердца [14, 15]. Установлено, что применение ГК-2 существенно снижало выраженность процессов дистрофического изменения и гибели нейронов даже в высокочувствительных к гипоксии нейрональных популяциях (пирамидные нейроны секторов СА1 и СА4 гиппокампа, клетки Пуркинье мозжечка). Существенно, что улучшение состояния нейрональных популяций с помощью ГК-2 сопровождалось ускорением восстановления неврологического статуса реанимированных животных. Полученные результаты свидетельствуют о положительном воздействии ГК-2 на структурно-функциональное состояние мозга при ишемии-реперфузии, однако механизмы его нейропротективного действия изучены недостаточно.

Известно, что нейротрофины способны влиять на экспрессию других нейротрофинов, участвуя в ее регуляции [16, 17]. Это дало основание предположить, что позитивные эффекты ГК-2 могут быть связаны с его влиянием на экспрессию других представителей семейства нейротрофинов — мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и нейротрофина-4 (NT4), характеризующихся нейропротективными свойствами. Представляло также интерес оценить влияние

ГК-2 на уровень основного фактора роста фибробластов (FGFb), экспрессию которого NGF может активировать [18]. Ключевые функции FGFb в нервной системе сходны с нейротрофинами [19, 20]. Установлено, что применение экзогенного bFGF защищает нейроны при очаговой ишемии мозга [21—23].

*Целью настоящей работы* было оценить, какое влияние оказывает ГК-2 на уровень экспрессии FGFb, NT4, BDNF и процесс гибели нейронов в постреанимационном периоде после временной остановки сердца у крыс.

### Методика

У 20 белых беспородных крыс самцов массой 190—250 г под эфирным наркозом вызывали остановку сердца на 12 мин путем внутриторакального пережатия сосудистого пучка сердца [24]. Оживление проводили непрямым массажем сердца в сочетании с искусственной вентиляцией легких воздухом при внутритрахеальном введении раствора адреналина в дозе 0,1 мг/кг. 10 крысам вводили ГК-2 (1 мг/кг в/б) через 30 мин и 48 ч после оживления. 10 нелеченых животных в те же сроки получали эквивалентные дозы физиологического раствора. Контролем служили ложноперированные крысы ( $n = 10$ ). Через 7 дней после реанимации животных выводили из эксперимента декапитацией под эфирным наркозом. Эксперименты проводились согласно рекомендациям Этического комитета ФГБНУ НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минздрава СССР №755 от 12.08.1977).

С помощью гистологических и иммуногистохимических исследований оценивали постреанимационные изменения состояния высокочувствительной к гипоксии популяции клеток Пуркинье (КП) коры мозжечка. Гистологический анализ проводили на парафиновых срезах толщиной 5—6 мкм, окрашенных крезильным фиолетовым по Нисслю. Определяли общую плотность нейрональной популяции (общее число КП на 1 мм длины их слоя). Иммуногистохимические исследования проводили непрямым пероксидазно-антипероксидазным методом с использованием поликлональных антител к FGFb (разведение 1:200), к NT4 (разведение 1:100) и к BDNF (разведение 1:50) (Santa Cruz, USA) с использованием визуализирующих систем En-Vision™ Kit и LSAB (DAKO, Glostrup, Denmark). Иммуногистохимическая реакция контролировалась инкубацией срезов со всеми реагентами кроме первичных антител. При иммуногистохимическом исследовании для каждого фактора выделяли негативные (FGFb-,

NT4-, BDNF-) и позитивные нейроны с различным уровнем экспрессии — слабым (FGFb<sup>+</sup>, NT4<sup>+</sup>, BDNF<sup>+</sup>) и интенсивным (FGFb<sup>++</sup>, NT4<sup>++</sup>, BDNF<sup>++</sup>). Определяли число нейронов с разным уровнем экспрессии изучаемых нейротрофических факторов на 1 мм длины их слоя. При морфометрических исследованиях использовали систему анализа изображений (компьютер Intel, микроскоп Olympus BX-500, программы Image Score M, Excel 2007). Статистическую обработку данных проводили с использованием U-критерия Манна—Уитни.

### Результаты и обсуждение

При гистологическом исследовании установлено, что у нелеченых реанимированных животных в сравнении с контролем общее число КП снижено на 13,2% (рис. 1), что свидетельствует о гибели нейронов. У реанимированных животных, леченных ГК-2, общее число КП не имело достоверных отличий от контроля. При этом у леченых животных в сравнении с нелечеными общее число КП было больше (рис. 1).

Следовательно, применение ГК-2 позволило предупредить гибель КП в постреанимационном периоде. Эти данные согласуются с полученными нами ранее результатами, свидетельствующими о нейропротективных свойствах ГК-2 [14, 15].

Иммуногистохимическое исследование уровня экспрессии FGFb показало, что у нелеченых реанимированных крыс в сравнении с контролем число FGFb<sup>-</sup> КП снижено на 68,8% (рис. 1). Общее число FGFb-позитивных клеток не отличалось от контрольного уровня, однако число FGFb<sup>+</sup> КП было уменьшено (на 26,0%), а число FGFb<sup>++</sup> КП увеличено (на 40,7%) (рис. 1). У леченых ГК-2 реанимированных крыс число FGFb<sup>-</sup> КП соответствовало контрольному

уровню. Общее число FGFb-позитивных клеток не отличалось от контроля, однако число FGFb<sup>+</sup> КП было уменьшено (на 28,0%), а число FGFb<sup>++</sup> КП — увеличено (на 35,2%) (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что как у леченых, так и у нелеченых животных в постреанимационном периоде происходит резкое увеличение числа FGFb<sup>++</sup> нейронов. Учитывая, что при этом общее число FGFb-позитивных нейронов не изменялось, можно заключить, что в обеих исследованных группах реанимированных животных происходит «переход» слабо экспрессирующих FGFb<sup>+</sup> клеток в категорию сильно экспрессирующих (FGFb<sup>++</sup>), вследствие чего уровень экспрессии у FGFb в популяции КП возрастал. Существенно, что у нелеченых животных число FGFb<sup>-</sup> КП было на 65,5% меньше, чем у леченых, в то время как по числу FGFb-позитивных клеток, как слабо-, так и сильноокрашенных, различий между лечеными и нелечеными животными не обнаружено. Эти данные позволяют заключить, что у нелеченых реанимированных животных при выпадении КП в постреанимационном периоде гибели подвергаются FGFb-негативные, т.е. не экспрессирующие этот фактор нейроны. Следовательно, способность нейронов к экспрессии FGFb является важным фактором их устойчивости при ишемии-реперфузии. На это указывают и сведения о том, что после временной ишемии переднего мозга снижение экспрессии FGFb в пирамидных нейронах сектора CA1 гиппокампа приводило к их гибели [23]. Показано также, что экзогенное введение FGFb улучшает структурно-функциональное состояние мозга после ишемии [25, 26, 22]. Позитивные эффекты FGFb связывают с его способностью ингибировать активность провоспалительных факторов [27], а также усиливать нейрогенез стволовых клеток после ишемии [25, 28]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что ишемия-реперфузия существенно влияет на уровень экспрессии FGFb, вызывая его активацию в популяции КП у реанимированных животных обеих экспериментальных групп. Развивающаяся в постреанимационном периоде гибель клеток, выявленная при гистологическом анализе у нелеченых животных, связана с потерей FGFb-негативных нейронов. Применение ГК предупреждало развитие процесса постреанимационной гибели FGFb-негативных КП, однако не влияло на уровень экспрессии FGFb.

Иммуногистохимическое исследование уровня экспрессии NT4 показало, что у нелеченых реанимированных крыс в сравнении с контролем число NT4<sup>-</sup> КП снижено на 37,5%, а число NT4<sup>+</sup> и NT4<sup>++</sup> КП соответствовало контрольному уровню (рис. 2). У леченых ГК-2 реанимированных крыс число NT4<sup>-</sup>, NT4<sup>+</sup> и NT4<sup>++</sup> КП не отличалось от контроля (рис. 2). При этом у леченых животных в сравнении

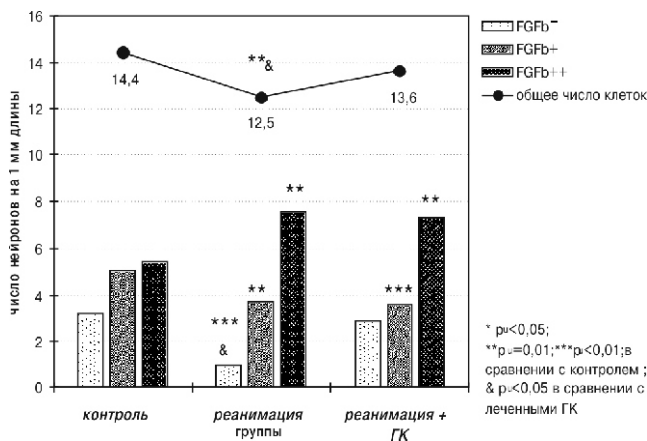


Рис. 1. Общая плотность популяции клеток Пуркинье и число нейронов с разным уровнем экспрессии FGFb у животных различных экспериментальных групп.

с нелечеными число NT4-негативных КП было больше, а по числу NT4<sup>+</sup> и NT4<sup>++</sup> КП группы реанимированных животных не различались (рис. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что развивающаяся после ишемии-реперфузии гибель клеток, выявленная при гистологическом анализе у нелеченых животных, связана с потерей NT4-негативных нейронов. Применение ГК-2 позволило предупредить развитие процесса постреанимационной гибели NT4-негативных КП, однако не влияло на уровень экспрессии NT4. В отношении постишемических изменений уровня экспрессии NT4 сведений крайне мало. При этом отмечается, что BDNF — близкий к NT4 и также действующий через тирозинкиназные рецепторы TrkB — характеризуется значительно более мощными нейропротективными свойствами [29, 30].

Иммуногистохимическое исследование уровня экспрессии BDNF показало, что у нелеченых реанимированных крыс в сравнении с контролем число BDNF<sup>-</sup> КП было снижено на 55,2%, а число BDNF<sup>+</sup> и BDNF<sup>++</sup> КП не имело отличий от контроля (рис. 3). У леченых ГК-2 реанимированных крыс в сравнении с контролем число BDNF<sup>-</sup> КП также было снижено на 52,6%. Однако при этом общее число BDNF-позитивных нейронов возрастало (на 14,3%,  $p_u < 0,05$ ) за счет увеличения числа BDNF<sup>++</sup> КП (на 21,6%) (рис. 3). Существенно, что у леченых крыс в сравнении с нелечеными было увеличено и общее число BDNF-позитивных КП (на 15,6%), и число BDNF<sup>++</sup> КП (на 18,4%) (рис. 3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что уменьшение общей плотности популяции КП, выявленное при гистологическом анализе у нелеченых реанимированных крыс, происходит вследствие потери BDNF-нейронов. В противоположность этому, у леченых ГК-2 реанимированных крыс снижение числа BDNF-негативных КП было связано не с их гибелью, а с переходом в категорию BDNF-позитивных, причем активно экспрессирующих BDNF (BDNF<sup>++</sup>) нейронов. Следовательно, применение ГК-2 способствовало предупреждению постреанимационной гибели нейронов, «запускающей» экспрессию BDNF в клетках, ранее не вырабатывающих этот фактор. Нейропротективные свойства BDNF показаны на различных экспериментальных моделях ишемии [31, 32]. Защитное действие BDNF связывают с его антиапоптотическими, противовоспалительными, а также антицитотоксическими свойствами [31, 33—35]. Интересно, что эффективность различных воздействий, способствующих уменьшению повреждения мозга при ишемии (гипотермия, гипербарическая оксигенация, ишемическое прекондиционирование, трансплантация микроглии, введение прогестерона, двигательная активность) связывают с активацией экспрессии BDNF [3, 36—41].

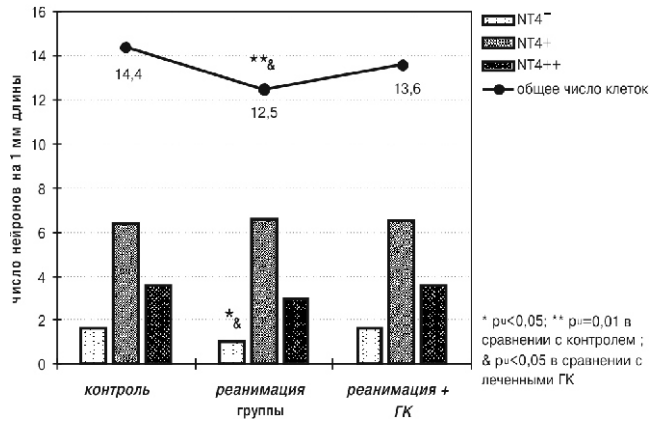


Рис. 2. Общая плотность популяции клеток Пуркинью и число нейронов с разным уровнем экспрессии NT4 у животных различных экспериментальных групп.

### Заключение

В целом, результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что в постреанимационном периоде у нелеченых животных происходит гибель нейронов, которой подвергаются NT4-негативные, FGFb-негативные и BDNF-негативные клетки. Применение ГК-2 не влияло на уровень экспрессии FGFb и NT4, однако способствовало увеличению уровня экспрессии BDNF. Иницируя экспрессию BDNF в клетках, ранее не вырабатывающих этот фактор, ГК-2 предупреждал развитие постреанимационной гибели нейронов. Полученные в работе факты позволяют заключить, что, по крайней мере, одним из механизмов нейропротективного действия миметика фактора роста нервов ГК-2 является его способность активизировать экспрессию BDNF в нервных клетках.

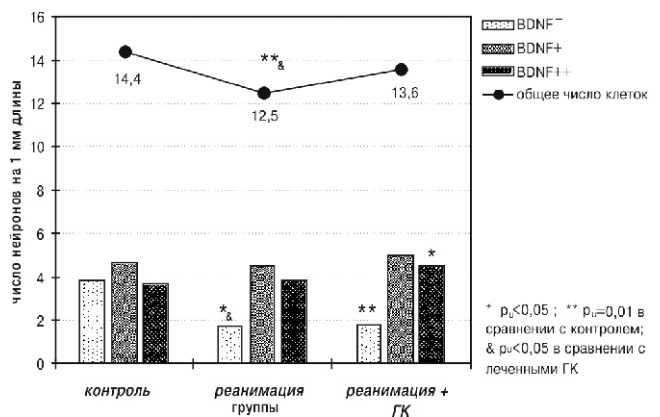


Рис. 3. Общая плотность популяции клеток Пуркинью и число нейронов с разным уровнем экспрессии BDNF у животных различных экспериментальных групп.



## Список литературы

- Bothwell M. NGF, BDNF, NT3, and NT4. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2014; 220: 3-15.
- Callaghan C.K., Kelly A.M. Neurotrophins play differential roles in short and long-term recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2013; 104: 39-48.
- Lee T., Yang J., Ko J., Kato H., Itouama Y., Kogure K. Influence of ischemic preconditioning on levels of nerve growth factor, Brain -derived neurotrophic factor and their high-affinity receptors in hippocampus following forebrain ischemia. *Brain res.* 2008; 2 (1187): 1-11.
- Matsuda F., Sakakima H., Yoshida Y. The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats. *Acta Physiol. (Oxf.)*. 2011; 201(2): 275-287.
- Yang J.P., Liu H.J., Yang H., Feng P.Y. Therapeutic time window for the neuroprotective effects of NGF when administered after focal cerebral ischemia. *Neurol. Sci.* 2011; 32(3): 433-41.
- Yin X., Meng F., Wei W., Li A., Wang Y., Chai Y. et al. Role of mouse nerve growth factor in neural recovery following hypoxic-ischemic brain damage. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2013; 6(10): 951-5.
- Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов. *Доклады Академии наук.* 2010; 434(4): 549-52.
- Гудашева Т. А., Антипова Т. А., Константинопольский М. А., Поварнина П.Ю., Середенин С.Б. Оригинальный дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 избирательно активизирует пострецепторные пути TrkA, не вызывая побочных действий полноразмерного нейротрофина. *Доклады Академии наук.* 2014; 456(2): 231-5.
- Поварнина П.Ю., Озерова И.В., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Антидиабетическая активность оригинального дипептидного миметика фактора роста нервов. *Докл. Академии наук.* 2013; 449(3): 364-6.
- Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Исследование in vitro нейропротективных свойств нового оригинального миметика фактора роста нервов ГК-2. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2010; 150(11): 537-40.
- Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А., Воронцова О.Н., Бондаренко Н.А., Середенин С.Б. Антипаркинсонические свойства дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 в экспериментах in vivo. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2011; 151(6): 634-7.
- Середенин С.Б., Романова Г.А., Гудашева Т.А., Шакова Ф.М., Барсков И.В., Стельмашук Е.В. и др. Нейропротективное и антиамнестическое действие дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 при экспериментальном ишемическом инфаркте коры головного мозга. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2010; 150(10): 406-9.
- Середенин С.Б., Силачев Д.Н., Гудашева Т.А., Пирогов Ю.А., Исаев Н.К. Исследование нейропротекторного действия дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 при индуцированной экспериментальной фокальной ишемии в бассейне средней мозговой артерии. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2011; 151(5): 518-21.
- Аврущенко М.Ш., Заржецкий Ю.В., Мороз В.В., Острова И.В., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Влияние миметика фактора роста нервов ГК-2 на структурно-функциональное состояние мозга в раннем постреанимационном периоде. *Общая реаниматология.* 2012; 8(5): 19-23.
- Заржецкий Ю.В., Аврущенко М.Ш., Мороз В.В., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Эффективность миметика фактора роста нервов ГК-2 для предупреждения постреанимационных изменений мозга. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2015; 159(4): 442-5.
- Patz S., Wahle P. Neurotrophins induce short-term and long-term changes of cortical neurotrophin expression. *Eur. J. Neurosci.* 2004; 20(3): 701-8.
- Kuo L.T., Groves M.J., Scaravilli F., Sugden D., An S.F. Neurotrophin-3 administration alters neurotrophin, neurotrophin receptor and nestin mRNA expression in rat dorsal root ganglia following axotomy. *Neuroscience.* 2007; 147(2): 491-507.
- Lee Y.W., Stachowiak E.K., Birkaya B., Terranova C., Capacchietti M., Claus P. et al. NGF-induced cell differentiation and gene activation is mediated by integrative nuclear FGFR1 signaling (INFS). *PLoS One.* 2013; 8(7): e68931.
- Rose K., Kriha D., Pallast S., Junker V., Klumpp S., Krieglstein J. Basic fibroblast growth factor: lysine 134 is essential for its neuroprotective activity. *Neurochem. Int.* 2007; 51(1): 25-31.
- Zechel S., Werner S., Unsicker K., von Bohlen und Halbach O. Expression and functions of fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in hippocampal formation. *Neuroscientist.* 2010; 16(4): 357-73.
- Martinez G., Di Giacomo C., Sorrenti V., Carnazza M.L., Ragusa N., Barcellona M.L., Vanella A. Fibroblast growth factor-2 and transforming growth factor-beta1 immunostaining in rat brain after cerebral postischemic reperfusion. *J. Neurosci. Res.* 2001; 63(2): 136-42.
- Ye J., Lin H., Mu J., Cui X., Ying H., Lin M. et al. Effect of basic fibroblast growth factor on hippocampal cholinergic neurons in a rodent model of ischaemic encephalopathy. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2010; 107(6): 931-9.
- Okada T., Kataoka Y., Takeshita A., Mino M., Morioka H., Kusakabe K.T. et al. Effects of transient forebrain ischemia on the hippocampus of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): an immunohistochemical study. *Zoolog. Sci.* 2013; 30(6): 484-9.
- Корпачев В.Г., Лысенков С.П., Тель Л.З. Моделирование клинической смерти и постреанимационной болезни у крыс. *Патол. физиол. и эксперим. терапия.* 1982; 3: 78-80.
- Leker R.R., Soldner F., Velasco I., Gavin D.K., Androussellis-Theotokis A., McKay R.D. Long-lasting regeneration after ischemia in the cerebral cortex. *Stroke.* 2007; 38(1): 153-61.
- Watanabe T., Okuda Y., Nonoguchi N., Zhao M.Z., Kajimoto Y., Furutama D. et al. Postischemic intraventricular administration of FGF-2 expressing adenoviral vectors improves neurologic outcome and reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2004; 24(11): 1205-13.
- Zhang M., Ma Y.F., Gan J.X. Jiang G.Y., Xu S.X., Tao X.L. et al. Basic fibroblast growth factor alleviates brain injury following global ischemia reperfusion in rabbits. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2005; 6(7): 637-43.
- Wang Z.L., Cheng S.M., Ma M.M., Ma Y.P., Yang J.P., Xu G.L. et al. Intranasally delivered bFGF enhances neurogenesis in adult rats following cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* 2008; 446(1): 30-5.
- Chung J.Y., Kim M.W., Bang M.S., Kim M. Increased expression of neurotrophin 4 following focal cerebral ischemia in adult rat brain with treadmill exercise. *PLoS One.* 2013; 8(3): e52461.
- Endres M., Fan G., Hirt L., Jaenisch R. Stroke damage in mice after knocking the neurotrophin-4 gene into the brain-derived neurotrophic factor locus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2003; 23(2): 150-3.



31. Chen A., Xiong L.-J., Tong Y., Mao M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury (Review). *Biomedical reports*. 2013; 1: 167-76.

32. Geral C., Angelova A, Lesieur S. From Molecular to Nanotechnology Strategies for Delivery of Neurotrophins: Emphasis on Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). *Pharmaceutics*. 2013; 5: 127-67.

33. Huang L., Applegate P.M., Gatling J.W., Mangus D.B., Zhang J. and Applegate R.L. A systematic review of neuroprotective strategies after cardiac arrest: from bench to bedside (part II-comprehensive protection). *Medical Gas Research*. 2014; 4: 10.

34. Kim D.H., Zhao X., Tu C.H., Casaccia-Bonnel P., Chao M.V. Prevention of apoptotic but not necrotic cell death following neuronal injury by neurotrophins signaling through the tyrosine kinase receptor. *J. Neurosurg*. 2004; 100 (1): 79-87.

35. Liu Z., Ma D., Feng G., Ma Y. and Hu H. Recombinant AAV-mediated expression of human BDNF protects neurons against cell apoptosis in Abeta-induced neuronal damage model. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci*. 2007; 27: 233-6.

36. D'Cruz B.J., Fertig K.C., Filiano A.J., Hicks S.D., DeFranco D.B., Callaway C.W. Hypothermic reperfusion after cardiac arrest augments brain-derived neurotrophic factor activation. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2002; 22 (7): 843-51.

37. Ishrat T., Sayeed I., Atif F., Hua F., Stein D.G. Progesterone is neuroprotective against ischemic brain injury through its effects on the PI3K/Akt signaling pathway. *Neuroscience*. 2012; 210: 442-50.

38. Kim G., Kim E. The Effects of antecedent exercise on motor function recovery and brain-derived neurotrophic factor expression after focal cerebral ischemia in rats. *J. Phys. Ther. Sci*. 2013; 25: 553-6.

39. Narantuya D., Nagai A., Sheikh A.M., Masuda J., Kobayashi S., Yamaguchi S. et al. Human microglia transplanted in rat focal ischemia brain induce neuroprotection and behavioral improvement. *PLoS One*. 2010; 5(7): e11746.

40. Ostrowski R.P., Graupner G., Titova E., Zhang J., Dach N., Corleone D. et al. The hyperbaric oxygen preconditioning-induced brain is mediated by a reduction of early apoptosis after transient cerebral ischemia. *Neurobiol. Dis*. 2008; 29(1): 1-13.

41. Singh M., Su C. Progesterone-induced neuroprotection: factors that may predict therapeutic efficacy. *Brain Res*. 2013; 1514: 98-106.

Поступила 18.05.15

## References

1. Bothwell M. NGF, BDNF, NT3, and NT4. *Handb. Exp. Pharmacol*. 2014; 220: 3-15.

2. Callaghan C.K., Kelly A.M. Neurotrophins play differential roles in short and long-term recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem*. 2013; 104: 39-48.

3. Lee T., Yang J., Ko J., Kato H., Itouama Y., Kogure K. Influence of ischemic preconditioning on levels of nerve growth factor, Brain -derived neurotrophic factor and their high-affinity receptors in hippocampus following forebrain ischemia. *Brain res*. 2008; 2 (1187): 1-11.

4. Matsuda F., Sakakima H., Yoshida Y. The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats. *Acta Physiol. (Oxf.)*. 2011; 201(2): 275-87.

5. Yang J.P., Liu H.J., Yang H., Feng P.Y. Therapeutic time window for the neuroprotective effects of NGF when administered after focal cerebral ischemia. *Neurol. Sci*. 2011; 32(3): 433-41.

6. Yin X., Meng F., Wei W., Li A., Wang Y., Chai Y. et al. Role of mouse nerve growth factor in neural recovery following hypoxic-ischemic brain damage. *Int. J. Clin. Exp. Med*. 2013; 6(10): 951-5.

7. Gudasheva T.A., Antipova T.A., Seredenin S.B. Novel low molecular weight mimetics of nerve growth factor. *Doklady Akademii nauk*. 2010; 434(4): 549-52.

8. Gudasheva T. A., Antipova T. A., Konstantinopol'skij M.A., Povarnina P.Ju., Seredenin S.B. Original nerve growth factor dipeptide mimetic GK-2 selectively activates TrkA postreceptor path without side effects of full-length neurotrophin. *Doklady Akademii nauk*. 2014; 456(2): 231-5.

9. Povarnina P.Ju., Ozerova I.V., Ostrovskaja R.U., Gudasheva T.A., Seredenin S.B. Antidiabetic activity of a novel dipeptide mimetic of nerve growth factor. *Dokl. Akademii nauk*. 2013; 449(3): 364-6.

10. Antipova T.A., Gudasheva T.A., Seredenin S.B. In vitro study of neuroprotective properties of GK-2, a new original nerve growth factor mimetic. *Bjull. jeksperim. boil. i med*. 2010; 150(11): 537-40.

11. Povarnina P.Ju., Gudasheva T.A., Voroncova O.N., Bondarenko N.A., Seredenin S.B. Antiparkinsonian properties of a nerve growth factor dipeptide mimetic GK-2 in vivo experiments. *Bjull. jeksperim. biol. i med*. 2011; 151(6): 634-7.

12. Seredenin S.B., Romanova G.A., Gudasheva T.A., Shakova F.M., Barskov I.V., Stel'mashuk E.V. i dr. Neuroprotective and antiamnestic effect of nerve growth factor dipeptide mimetic GK-2 in experimental ischemic infarction of brain cortex. *Bjull. jeksperim. biol. i med*. 2010; 150(10): 406-9.

13. Seredenin S.B., Silachev D.N., Gudasheva T.A., Pirogov Ju.A., Isaev N.K. Neuroprotective effect of GK-2, a dipeptide mimetic of nerve growth factor, during experimental focal ischemia in middle cerebral artery basin. *Bjull. jeksperim. biol. i med*. 2011; 151(5): 518-21.

14. Avrushhenko M.Sh., Zarzheckij Ju.V., Moroz V.V., Ostrova I.V., Gudasheva T.A., Seredenin S.B. Effect of the nerve growth factor mimetic GK-2 on brain structural and functional state in the early postresuscitation period. *Obschaja reanimatologija*. 2012; 8(5): 19-23.

15. Zarzheckij Ju.V., Avrushhenko M.Sh., Moroz V.V., Gudasheva T.A., Seredenin S.B. The efficiency of the nerve growth factor mimetic GK-2 in preventing postresuscitation changes in the brain. *Bjull. jeksperim. biol. i med.* 2015; 159(4): 442-5.

16. Patz S., Wahle P. Neurotrophins induce short-term and long-term changes of cortical neurotrophin expression. *Eur. J. Neurosci*. 2004; 20(3): 701-8.

17. Kuo L.T., Groves M.J., Scaravilli F., Sugden D., An S.F. Neurotrophin-3 administration alters neurotrophin, neurotrophin receptor and nestin mRNA expression in rat dorsal root ganglia following axotomy. *Neuroscience*. 2007; 147(2): 491-507.

18. Lee Y.W., Stachowiak E.K., Birkaya B., Terranova C., Capacchietti M., Claus P. et al. NGF-induced cell differentiation and gene activation is mediated by integrative nuclear FGFR1 signaling (INFS). *PLoS One*. 2013; 8(7): e68931.

19. Rose K., Kriha D., Pallast S., Junker V, Klumpp S, Krieglstein J. Basic fibroblast growth factor: lysine 134 is essential for its neuroprotective activity. *Neurochem. Int*. 2007; 51(1): 25-31.

20. Zechel S., Werner S., Unsicker K., von Bohlen und Halbach O. Expression and functions of fibroblast growth

factor 2 (FGF-2) in hippocampal formation. *Neuroscientist*. 2010; 16(4): 357-73.

21. Martinez G., Di Giacomo C., Sorrenti V., Carnazza M.L., Ragusa N., Barcellona M.L., Vanella A. Fibroblast growth factor-2 and transforming growth factor-beta1 immunostaining in rat brain after cerebral postischemic reperfusion. *J. Neurosci. Res*. 2001; 63(2): 136-42.

22. Ye J., Lin H., Mu J., Cui X., Ying H., Lin M. et al. Effect of basic fibroblast growth factor on hippocampal cholinergic neurons in a rodent model of ischaemic encephalopathy. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2010; 107(6): 931-9.

23. Okada T., Kataoka Y., Takeshita A., Mino M., Moriooka H., Kusakabe K.T. et al. Effects of transient forebrain ischemia on the hippocampus of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): an immunohistochemical study. *Zoolog. Sci.* 2013; 30(6): 484-9.

24. Korpachev V.G., Lysenkov S.P., Tel' L.Z. Modeling of clinical death and postresuscitative disease in rats. *Patol. fiziol. i jeksperim. terapija*. 1982; 3: 78-80.

25. Leker R.R., Soldner F., Velasco I., Gavin D.K., Androutsellis-Theotokis A., McKay R.D. Long-lasting regeneration after ischemia in the cerebral cortex. *Stroke*. 2007; 38(1): 153-61.

26. Watanabe T., Okuda Y., Nonoguchi N., Zhao M.Z., Kajimoto Y., Furutama D. et al. Postischemic intraventricular administration of FGF-2 expressing adenoviral vectors improves neurologic outcome and reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2004; 24(11): 1205-13.

27. Zhang M., Ma Y.F., Gan J.X. Jiang G.Y., Xu S.X., Tao X.L. et al. Basic fibroblast growth factor alleviates brain injury following global ischemia reperfusion in rabbits. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. 2005; 6(7): 637-43.

28. Wang Z.L., Cheng S.M., Ma M.M., Ma Y.P., Yang J.P., Xu G.L. et al. Intranasally delivered bFGF enhances neurogenesis in adult rats following cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* 2008; 446(1): 30-5.

29. Chung J.Y., Kim M.W., Bang M.S., Kim M. Increased expression of neurotrophin 4 following focal cerebral ischemia in adult rat brain with treadmill exercise. *PLoS One*. 2013; 8(3): e52461.

30. Endres M., Fan G., Hirt L., Jaenisch R. Stroke damage in mice after knocking the neurotrophin-4 gene into the brain-derived neurotrophic factor locus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2003; 23(2): 150-153.

31. Chen A., Xiong L.-J., Tong Y., Mao M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury (Review). *Biomedical reports*. 2013; 1: 167-76.

32. Geral C., Angelova A., Lesieur S. From Molecular to Nanotechnology Strategies for Delivery of Neurotrophins: Emphasis on Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). *Pharmaceutics*. 2013; 5: 127-67.

33. Huang L., Applegate P.M., Gatling J.W., Mangus D.B., Zhang J. and Applegate R.L. A systematic review of neuroprotective strategies after cardiac arrest: from bench to bedside (part II-comprehensive protection). *Medical Gas Research*. 2014; 4: 10.

34. Kim D.H., Zhao X., Tu C.H., Casaccia-Bonnel P., Chao M.V. Prevention of apoptotic but not necrotic cell death following neuronal injury by neurotrophins signaling through the tyrosine kinase receptor. *J. Neurosurg.* 2004; 100(1): 79-87.

35. Liu Z., Ma D., Feng G., Ma Y. and Hu H. Recombinant AAV-mediated expression of human BDNF protects neurons against cell apoptosis in Abeta-induced neuronal damage model. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 2007; 27: 233-6.

36. D'Cruz B.J., Fertig K.C., Filiano A.J., Hicks S.D., DeFranco D.B., Callaway C.W. Hypothermic reperfusion after cardiac arrest augments brain-derived neurotrophic factor activation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002; 22(7): 843-51.

37. Ishrat T., Sayeed I., Atif F., Hua F., Stein D.G. Progesterone is neuroprotective against ischemic brain injury through its effects on the PI3K/Akt signaling pathway. *Neuroscience*. 2012; 210: 442-50.

38. Kim G., Kim E. The Effects of antecedent exercise on motor function recovery and brain-derived neurotrophic factor expression after focal cerebral ischemia in rats. *J. Phys. Ther. Sci.* 2013; 25: 553-6.

39. Narantuya D., Nagai A., Sheikh A.M., Masuda J., Kobayashi S., Yamaguchi S. et al. Human microglia transplanted in rat focal ischemia brain induce neuroprotection and behavioral improvement. *PLoS One*. 2010; 5(7): e11746.

40. Ostrowski R.P., Graupner G., Titova E., Zhang J., Dach N., Corleone D. et al. The hyperbaric oxygen preconditioning-induced brain is mediated by a reduction of early apoptosis after transient cerebral ischemia. *Neurobiol. Dis.* 2008; 29(1): 1-13.

41. Singh M., Su C. Progesterone-induced neuroprotection: factors that may predict therapeutic efficacy. *Brain Res*. 2013; 1514: 98-106.

Received 18.05.15

### Сведения об авторах:

Острова Ирина Васильевна, к.биол.н., ст. науч. сотр. лаб. патологии клетки при критических состояниях ФГБНУ «НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского», e-mail: irinaostrova@mail.ru

Заржецкий Юрий Витальевич, д.биол.н., вед. науч. сотр. лаб. патофизиологии при критических состояниях ФГБНУ «НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского»

Мороз Виктор Васильевич, д.м.н., проф., член-корр. РАН, директор ФГБНУ «НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского»

Гудашева Татьяна Александровна, д.биол.н., проф., член-корр. РАН, руководитель отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», e-mail: tata-sosnovka@mail.ru

Середенин Сергей Борисович, д.м.н., проф., акад. РАН, директор ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», e-mail: zakusovpharm@mail.ru

Кметь Т.И., Ткачук С.С.

## **Динамика изменений морфофункционального состояния p53-положительных клеток коры височной доли полушарий головного мозга крыс под влиянием каротидной ишемии-реперфузии**

Буковинский государственный медицинский университет Минздрава Украины, 58002, Черновцы, Театральная площадь, 2

*Исследовано влияние двусторонней 20-минутной каротидной ишемии с реперфузией различной продолжительности на активность апоптотических процессов в нейронах и глиальных клетках коры височной доли больших полушарий мозга крыс. Показано, что двусторонняя каротидная ишемия с одночасовой реперфузией увеличивает плотность расположения p53<sup>+</sup>-нейроцитов в указанном участке коры, а также повышает процент и плотность p53<sup>+</sup>-нервных клеток и снижает процент и плотность p53<sup>+</sup>-глиоцитов — на 12-е сут. постишемического периода. Ишемически-реперфузионное повреждение головного мозга увеличивает концентрацию белка p53 в глиоцитах коры височной доли в раннем ишемически-реперфузионном периоде и снижает ее в нейро- и глиоцитах — в позднем.*

**Ключевые слова:** кора височной доли; ишемия-реперфузия; апоптоз

Kmet T.I., Tkachuk S.S.

## **Dynamics of changes of p53-positive cells morphofunctional condition in the cerebral cortex of the temporal lobe in rats affected by carotid ischemia-reperfusion**

Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine

*The influence of bilateral 20-minute carotid ischemia with reperfusion of various duration upon the activity of apoptotic processes in the neurons and glia cells of the cerebral cortex in the temporal lobe of rats has been studied. Bilateral carotid ischemia with one-hour reperfusion has been indicated to increase the location density of p53<sup>+</sup>-neurocytes in this region of the cerebral cortex, increases percentage and density of p53<sup>+</sup>-nerve cells and reduces the percentage and density of p53<sup>+</sup>-glia cells on the 12<sup>th</sup> day of the post-ischemic period. Ischemic-reperfusion lesion of the brain increases the concentration of p53 protein in glia cells of the cerebral cortex in the temporal region in the early ischemic-reperfusion period and reduces it in nerve and glia cells in the late one.*

**Key words:** cerebral cortex of the temporal lobe; ischemia-reperfusion; apoptosis

Острая цереброваскулярная недостаточность призна-на весомой медико-социальной проблемой, поскольку в структуре заболеваемости и смертности населения занимает второе место после сердечно-сосудистой патологии [1]. В спектре патологических состояний, обусловленных острым нарушением мозгового кровообращения, доминирующая роль принадлежит ишемическим поражениям, которые составляют более 85% всех случаев мозговых инсультов [2]. Развитие неполной глобальной ишемии головного мозга приводит к нарушению энергетики нейронов, глии и эндотелиальных клеток, инициирует ишемический каскад и повреждение клеток центральной нервной системы [3, 4]. Исследования последних лет открыли новые патогенетические механизмы гемодинами-

ческих, клеточных и молекулярных изменений при этой патологии, которые приводят в конечном итоге к гибели нервной ткани путем некроза или апоптоза [5, 6].

Одним из хорошо изученных молекулярных маркеров клеточного апоптоза является белок p53 [7]. Его экспрессия стимулируется при повреждениях генетического аппарата клеток, а также при любых стимулах, особенно в центральной нервной системе, которые могут привести к подобным повреждениям или являются сигналом о неблагоприятном состоянии клеток. Функция белка p53 состоит в удалении из пула реплицирующихся клеток, тех, которые повреждены или являются потенциально опасными для организма. При отсутствии повреждений генетического аппарата белок p53 находится в неактивном состоянии, а при появлении повреждений ДНК активируется [8].

В настоящее время хорошо изучены морфофункциональные изменения эндотелиальных клеток сосу-

**Для корреспонденции:** Кметь Тарас Игоревич, к.м.н., доцент каф. гигиены и экологии Буковинского государственного медицинского университета, г.Черновцы, e-mail: kmet.taras@bsmu.edu.ua



дов коры различных долей полушарий головного мозга в условиях ишемии-реперфузии [9], однако особенности экспрессии маркера апоптоза в нейронах и глиоцитах различных долей неокортекса при данной патологии остаются недостаточно исследованы.

*Цель работы* — изучение влияния в динамике неполной глобальной ишемии головного мозга с последующей реперфузией различной продолжительности на плотность расположения  $\rho 53^+$  нейро- и глиоцитов коры височной доли (КВД) больших полушарий мозга крыс, а также содержание в них белка  $\rho 53$ .

### Методика

Исследование проведено на самцах белых нелинейных крыс, из которых были сформированы следующие экспериментальные группы:

- 1) контрольные крысы;
- 2) крысы, которым моделировали 20-минутную двустороннюю каротидную ишемию-реперфузию (ДКИ) с одночасовой реперфузией;
- 3) крысы, которых выводили из эксперимента на 12-е сут. после моделирования 20-минутной ДКИ.

Моделирование ДКИ осуществляли под калипсоловым наркозом (75 мг/кг) путем пережатия обеих общих сонных артерий [10], после чего кровотоки по этим сосудам восстанавливали. Для изучения ранних последствий ишемии-реперфузии мозга часть животных выводили из эксперимента через 1 ч после завершения реперфузионного периода, а отсроченных — на 12-е сут. Животных выводили из эксперимента декапитацией под калипсоловым наркозом. При помощи атласа стереотаксических координат [11] на холоде забирали КВД полушарий головного мозга, в течение 24 ч фиксировали в растворе Буэна и заливали в парафин, готовили гистологические срезы толщиной 5 мкм. Затем осуществляли депарафинизацию в ксилоле, регидратацию в нисходящих концентрациях этанола и отмывание в 0,1 М фосфатном буфере. Обработанные моноклональными антителами срезы изучали в флуоресцентном микроскопе AXIOSKOP (Zeiss, Германия). Исследовали плот-

ность расположения и морфометрические параметры  $\rho 53^+$ -клеток с помощью компьютерной системы цифрового анализа VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия). Статистическую значимость различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента для независимых выборок. Данные представлены в виде средних арифметических и стандартного отклонения.

### Результаты и обсуждение

Изучение серийных срезов КВД полушарий головного мозга контрольных животных показало (табл. 1), что количество  $\rho 53^+$ -глиоцитов в исследуемой доле в 3,5 раза выше, чем  $\rho 53^+$ -нейроцитов, что, вероятно, обусловлено более интенсивным уровнем апоптоза глиальных клеток.

Следует отметить, что 20-минутная ишемия с односторонней реперфузией привела к возрастанию плотности расположения  $\rho 53^+$ -положительных нервных клеток в КВД на 34% относительно контроля. В позднем постишемическом периоде (12-е сутки) в нейронах наблюдалось более выраженное повышение исследуемого показателя (на 80% — относительно такового у контрольных крыс и на 35% — относительно раннего срока исследования), а в глиальных клетках, наоборот, произошло уменьшение данного параметра на 28 и 42% соответственно.

Процентное соотношение различных классов  $\rho 53^+$  клеток КВД в раннем постишемическом периоде достоверно не изменилось. Однако на 12-е сутки ишемически-реперфузионного периода процент  $\rho 53^+$ -нейронов возрос более чем в 2 раза относительно показателя в контроле и на 64% — относительно раннего срока наблюдения, а процент глиальных клетках, наоборот, уменьшился на 27 и 22% соответственно.

Изучения последствий раннего воздействия ишемии-реперфузии головного мозга на концентрацию и содержание  $\rho 53^+$ -ИРМ (иммунореактивного материала) в КВД показало (табл. 2), что содержание белка  $\rho 53$  в глиоцитах достоверно возросло на 4 и 5% соответственно по сравнению с контрольной группой животных, а в нейронах — не изменилось. В условиях позднего

Таблица 1

Плотность расположения и процентное соотношение  $\rho 53^+$ -нейроцитов и глиоцитов в коре височной доли полушарий крыс с ишемически-реперфузионным повреждением головного мозга (на 1 мм<sup>2</sup>) ( $M \pm m$ )

Группа наблюдения	Количество $\rho 53^+$ -нейроцитов на 1 мм <sup>2</sup>	Количество $\rho 53^+$ -глиоцитов на 1 мм <sup>2</sup>
Контроль (n = 11)	20,39 ± 3,02	72,23 ± 7,70
	20,15 ± 2,58	79,85 ± 2,58
Ишемия-реперфузия 20 мин / 1 ч (n = 11)	27,23 ± 1,66*	89,90 ± 4,86
	25,35 ± 1,68	74,65 ± 1,68
Ишемия-реперфузия (12 суток) (n = 11)	36,73 ± 4,10*^	51,74 ± 4,82*^
	41,51 ± 3,27*^	58,49 ± 3,27*^

Примечание. В числителе — суммарная плотность различных классов клеток на 1 мм<sup>2</sup> коры височной доли полушарий головного мозга; в знаменателе — процент различных классов клеток; вероятность различий по сравнению с: \* — контролем; ^ — ишемией-реперфузией 20 мин / 1 ч



срока наблюдения имело место снижение концентрации белка р53 в нервных клетках на 8% относительно показателя в раннем сроке исследования, а глиальных клеток — на 3% относительно контроля и на 7% — относительно раннего ишемически-реперфузионного периода. На 12-е сутки наблюдения отмечалось повышение только общего содержания белка р53 в глиоцитах на 9% — относительно показателя у контрольных крыс.

ДКИ с одночасовой реперфузией вызвала в исследуемой части неокортекса усиление дисперсии распределения р53<sup>+</sup>-ИРМ в глиоцитах на 8% относительно контрольной группы животных. На 12-е сутки ишемически-реперфузионного периода данный параметр в нейронах возрос на 19% относительно контроля и на 12% — относительно раннего срока наблюдения, а в глиоцитах — на 11% по сравнению с контролем.

Изучение морфометрических параметров клеток КВД показало, что площадь р53<sup>+</sup>-нейронов в раннем и позднем ишемически-реперфузионном периодах не изменилась. Однако площадь р53<sup>+</sup>-глиальных клеток в раннем постишемическом периоде увеличилась на 5% относительно контроля, а в позднем постишемическом периоде зафиксирован рост данного показателя на 32% относительно контрольных крыс и на 18% — относительно раннего срока наблюдения. ДКИ с одночасовой реперфузией привела к снижению коэффициента элонгации р53<sup>+</sup>-нервных клеток на 8% относительно контроля, а коэффициент формы в данном сроке наблюдения не изменился. В позднем периоде ишемически-реперфузионного повреждения КВД полушарий головного мозга обнаружено, что коэффициент формы р53<sup>+</sup>нейроцитов воз-

рос на 13%, а коэффициент элонгации, наоборот, уменьшился на 7% относительно контроля. Данные морфометрические показатели р53<sup>+</sup>-глиальных клеток в оба периода наблюдения не изменились.

Результаты исследования показали, что двусторонняя каротидная ишемия-реперфузия в КВД полушарий головного мозга увеличивает плотность расположения р53<sup>+</sup>-нейроцитов в раннем постишемическом периоде, повышает процент и плотность р53<sup>+</sup>-нервных клеток и снижает процент и плотность р53<sup>+</sup>-глиоцитов — в позднем. Ишемически-реперфузионное повреждение головного мозга увеличивает концентрацию белка р53 в глиоцитах КВД в раннем ишемически-реперфузионном периоде и снижает ее в нейро- и глиоцитах — в позднем.

Белок р53 стабилизируется и его уровни возрастают в ответ на различные стрессы, такие как повреждение ДНК, гипоксия или аноксия. Литературные источники указывают на то, что накопление белка р53 начинается при уровне 0,2% кислорода, при котором происходит остановка репликации ДНК, хотя поврежденный нуклеиновых кислот, наличие которых можно было бы установить лабораторно, еще нет. В этих условиях имеет место АТФ-зависимое фосфорилирование р53, что стабилизирует этот белок [7]. Фосфорилирования N конца р53 специальными киназами стабилизирует его, поскольку делает невозможным связывание с белками Mdm2 и дальнейшую протеасомного деградацию [12]. Кроме того, фосфорилирование позволяет коактиваторам Р300 и РСАФ связываться с белком р53 и ацетилировать его C-конец, следствием чего являются конформационные изменения последнего и экспозиция ДНК-связываю-

Таблица 2

Содержание белка р53 и морфометрические параметры р53<sup>+</sup> нервных и глиальных клеток коры височной доли полушарий крыс с ишемически-реперфузионным повреждением головного мозга (M ± m)

Группа наблюдения	Концентрация р53-ИРМ E <sub>иф</sub>	Содержание р53-ИРМ E <sub>иф</sub>	Дисперсия распределения р53-ИРМ	Площадь, мкм <sup>2</sup>	Коэффициент формы	Коэффициент элонгации
Нервные клетки						
Контроль (n = 11)	0,383 ± 0,012	2,315 ± 0,042	52,24 ± 2,59	108,16 ± 10,22	0,500 ± 0,028	0,658 ± 0,017
Ишемия-реперфузия 20 мин / 1 ч (n = 11)	0,394 ± 0,004	2,244 ± 0,019	55,48 ± 1,14	90,08 ± 4,89	0,533 ± 0,013	0,604 ± 0,010 p <sub>1</sub> <0,01
Ишемия-реперфузия (12 суток) (n = 11)	0,364 ± 0,005 p <sub>2</sub> <0,001	2,288 ± 0,030	61,98 ± 1,57 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	102,72 ± 6,89	0,567 ± 0,018 p <sub>1</sub> <0,05	0,615 ± 0,014 p <sub>1</sub> <0,05
Глиальные клетки						
Контроль (n = 11)	0,342 ± 0,002	1,207 ± 0,019	50,22 ± 1,38	9,07 ± 0,44	0,806 ± 0,009	0,669 ± 0,008
Ишемия-реперфузия 20 мин / 1 ч (n = 11)	0,356 ± 0,002 p <sub>1</sub> <0,001	1,264 ± 0,011 p <sub>1</sub> <0,05	54,25 ± 0,68 p <sub>1</sub> <0,05	10,15 ± 0,25 p <sub>1</sub> <0,05	0,806 ± 0,005	0,669 ± 0,004
Ишемия-реперфузия (12 суток) (n = 11)	0,332 ± 0,003 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,001	1,314 ± 0,026 p <sub>1</sub> <0,01	55,63 ± 1,23 p <sub>1</sub> <0,01	11,93 ± 0,69 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,05	0,789 ± 0,012	0,649 ± 0,010

Примечание. — вероятность различий по сравнению: p<sub>1</sub> — с контролем (p<0,05, p<0,01, p<0,001); p<sub>2</sub> — с ишемией-реперфузией 20 мин / 1 ч (p<0,05, p<0,01, p<0,001)

щего домена, что позволяет взаимодействовать с определенными генами, активируя или подавляя их [13]. Таким образом, возрастание концентрации белка p53 в глиоцитах после 20-минутной ишемии-одночасовой реперфузии можно объяснить гипоксической активацией, а его снижение на 12-е сутки может быть следствием гибели глиоцитов вследствие усиления апоптоза, о чем свидетельствуют полученные нами данные о снижении процента и плотности расположения p53<sup>+</sup>-глиоцитов в данном периоде наблюдения.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности сравнительного исследования динамики апоптотических изменений клеток коры различных долей больших полушарий головного мозга крыс.

### Список литературы

1. Попов А.В., Максимов Н.Н., Бывальцев А.С. Анализ и прогноз показателей заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистой патологии у городских и сельских жителей. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2014; 16 (5, Suppl. 2): 927 — 9.
2. Bolacos J.P., Moro M.A., Lizasoain I. et al. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: therapeutic implications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009; 61(14): 1299-15.
3. Hertz L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. *Neuropharmacology*. 2008; 55(3): 289-309.
4. Mathers C., Boerma T., D.M. Global and regional causes of death. *Brit. Med. Bull.* 2009; 92: 7-32.
5. Chomova M., Tatarikova Z., Dobrota D. et al. Ischemia-induced inhibition of mitochondrial complex I in rat brain: effect of permeabilization method and electron acceptor. *Neurochem. Res.* 2012; 37 (5): 965-76.
6. Vaseva A.V., Marchenko N.D., Ji K. et al. P53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*. 2012; 149: 1536-48.
7. Hammond E.M., Giaccia A.J. The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 331: 718-25.
8. Chen C.H., Jiang Z., Yan J.H. et al. The involvement of programmed cell death 5 (PDCD5) in the regulation of apoptosis in cerebral ischemia/reperfusion injury. *CNS Neurosci Ther.* 2013; 19(8): 566-76.
9. Бойчук Т.Н., Кметь Т.И. Регионарные особенности реакции эндотелиальных клеток различных функциональных отделов коры больших полушарий крыс со стрептозототин-индуцированным диабетом, осложненным ишемически-реперфузионным повреждением головного мозга. *Вестник Казахского национального медицинского университета*. 2013; 5 (1): 64 — 7.
10. Скибо Г.Г. Использование различных экспериментальных моделей для изучения клеточных механизмов ишемического поражения мозга. *Патология*. 2004; 1(1): 22-30.
11. Konig J.F., Klippel P.A. *The rat brain. A stereotaxis atlas of forebrain and lower part of the brain stem*. Baltimore: The Williams and Wilkins Company; 1963. 162 p.
12. Vahteristo P., Taminen A., Karvinen P. et al. p53, CHK2, and CHK1 genes in Finnish families with Li-Fraumeni syndrome: further evidence of CHK2 in inherited cancer predisposition. *Cancer. Res.* 2001; 61: 5718-22.
13. Vakhrusheva O., Smolka C., Gajawada P. et al. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ. Res.* 2008; 102 (6): 703-10.

Поступила 05.05.15

### References

1. Popov A.V., Maksimov N.N., Byval'cev A.S. Analysis and forecasting the indicators of incidences and mortality from cardiovascular pathology at urban and rural population. *Izvestija Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk*. 2014; 16 (5, Suppl. 2): 927 — 9. (in Russian)
2. Bolacos J.P., Moro M. A., Lizasoain I. et al. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: therapeutic implications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009; 61(14): 1299-15.
3. Hertz L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. *Neuropharmacology*. 2008; 55(3): 289-309.
4. Mathers C., Boerma T., Fat D.M. Global and regional causes of death. *Brit. Med. Bull.* 2009; 92: 7-32.
5. Chomova M., Tatarikova Z., Dobrota D. et al. Ischemia-induced inhibition of mitochondrial complex I in rat brain: effect of permeabilization method and electron acceptor. *Neurochem Res.* 2012; 37(5): 965-76.
6. Vaseva A.V., Marchenko N.D., Ji K. et al. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*. 2012; 149: 1536-48.
7. Hammond E.M., Giaccia A.J. The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 331: 718-25.
8. Chen C.H., Jiang Z., Yan J.H. et al. The involvement of programmed cell death 5 (PDCD5) in the regulation of apoptosis in cerebral ischemia/reperfusion injury. *CNS Neurosci Ther.* 2013; 19(8): 566-76.
9. Bojchuk T.N., Kmet' T.I. Regional characteristics of response of endothelial cells of certain function areas of the cerebral cortex in rats with streptozocin-induced diabetes complicated by ischemia-reperfusion damage of brain. *Vesnik Kazhaskogo nacional'nogo medicinskogo universiteta*. 2013; 5(1): 64 — 7. (in Russian)
10. Skibo G.G. The use of various experimental models to study cellular mechanisms of cerebral ischemic lesions. *Patologija*. 2004; 1(1): 22-30. (in Russian)
11. Konig J.F., Klippel P.A. *The rat brain. A stereotaxis atlas of forebrain and lower part of the brain stem*. Baltimore: The Williams and Wilkins Company; 1963.
12. Vahteristo P., Taminen A., Karvinen P. et al. p53, CHK2, and CHK1 genes in Finnish families with Li-Fraumeni syndrome: further evidence of CHK2 in inherited cancer predisposition. *Cancer. Res.* 2001; 61: 5718-22.
13. Vakhrusheva O., Smolka C., Gajawada P. et al. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ. Res.* 2008; 102 (6): 703-10.

Received 05.05.15

### Сведения об авторах:

Ткачук Светлана Сергеевна, д.м.н., проф., зав. каф. физиологии им. Я.Д. Киршенבלата Буковинского государственного медицинского университета

Баранов М.В.<sup>1</sup>, Ковалев А.С.<sup>1</sup>, Перфилов Д.В.<sup>2</sup>, Черногоров Р.В.<sup>2</sup>, Репенкова Л.Г.<sup>2</sup>

## **Влияние моделированной микрогравитации на порог болевой чувствительности у человека при однократном приеме кеторолака**

<sup>1</sup> — Научно-исследовательский институт космической медицины ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, 115682, Москва, Ореховый бульвар, д. 28

<sup>2</sup> — Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское ш., д. 76а

*В серии экспериментов с участием человека получены данные, подтверждающие влияние моделируемых эффектов невесомости на болевую чувствительность. В условиях антиортостатической гипокинезии (АНОГ) и «сухой» иммерсии выявлено отсутствие снижения болевой чувствительности в утренние часы, характерное для обычных условий. Кеторолак, при определении порога болевой чувствительности (ПБЧ) по методу термоалгометрии, не оказывает влияния на болевую чувствительность. Однако условия моделированной невесомости существенно меняют фармакокинетику кеторолака, увеличивая скорость всасывания препарата и снижая его относительно биодоступность и время удержания в плазме крови. Это может потребовать изменения схем обезболивающей терапии в условиях космического полета.*

**Ключевые слова:** микрогравитация; болевая чувствительность; кеторолак; фармакокинетика

Baranov M.V., Kovalev A.S., Perfilov D.F., Chernogorov R.V., Repenkova L.G.

## **Influence of simulated microgravity on the threshold of pain sensitivity in humans with single dose of ketorolac**

*The data supporting the influence of simulated microgravity effects on pain sensitivity were obtained in the series of experiments involving human. In conditions of antiorthostatic hypokinesia (ANOH) and «dry» immersion revealed no reduction in pain sensitivity in the morning, which is typical for normal conditions. Ketorolac has no effect on pain sensitivity, when determining the pain threshold (PT) by method of thermoalgotometry. However, the conditions of simulated microgravity substantially alter the pharmacokinetics of ketorolac, increasing the rate of absorption of the drug and reduce its relative bioavailability and retention time in the blood plasma. This may require changes in pain therapy schemes in space flight.*

**Key words:** microgravity; pain sensitivity; ketorolac; pharmacokinetic

Проблема лечения боли, несмотря на значительные успехи в исследовании механизмов этого явления, в разработке современных средств и методов терапии, остается актуальной как для специалистов амбулаторно-поликлинического звена, так и для врачей стационаров. Целенаправленных исследований болевой чувствительности в условиях космического полета до настоящего времени не проводили, хотя предпосылки к изменениям в системе ноцицептивной чувствительности в условиях невесомости есть. В различных экспериментальных работах показана зависимость болевой чувствительности от толщины серого вещества и морфофункциональных особенностей со-

ответствующих корково-подкорковых структур головного мозга [1], состояние которых, в свою очередь, зависит от кровотока и объема интерстициальной жидкости [2]. Таким образом, перераспределение жидкости в краниальном направлении в условиях невесомости, может вызвать существенные сдвиги в восприятии болевых импульсов. В наземных экспериментах у крыс на модели микрогравитации выявлено повышение порога болевой чувствительности [3]. В системе медицинского обеспечения космических полетов проблему обезболивания традиционно решают с использованием классических схем практической «земной» медицины. Вместе с тем, особенности физиологии космонавта в условиях полета и в ближайшем послеполетном периоде, определенные сложности в использовании классических способов введения лекарственных веществ в невесомости требуют, как

**Для корреспонденции:** Баранов Михаил Викторович, к.м.н., зам. директора по медицинским вопросам НИИ космической медицины ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, e-mail: spacemedinstitute@yandex.ru

минимум, адаптации этих схем применительно к космическому полету, а как максимум — разработки новых схем обезболивания с использованием альтернативных способов введения лекарственных веществ. При отработке новых способов введения лекарственных препаратов и для прецизионной коррекции режима их дозирования необходимо понимать влияние микрогравитации и других условий космического полета как на фармакокинетику и фармакодинамику обезболивающих препаратов, так и на систему болевой чувствительности человека. Данные по фармакокинетики отдельных лекарственных препаратов в условиях космических полетов известны [4, 5], в то время как исследований болевой чувствительности до настоящего времени не проводились.

*Цель исследования* — изучение влияния моделированных эффектов невесомости на порог болевой чувствительности у человека при однократном приеме нестероидного противовоспалительного препарата — кеторолак.

### Методика

Исследование проводили с участием 40 испытуемых-добровольцев. В качестве моделей микрогравитации использовали антиортостатическую гипокинезию с углом  $15^\circ$  и «сухую» иммерсию.

Динамику изменения порога болевой чувствительности (ПБЧ) у испытуемых оценивали в трех экспериментальных сериях с АНОГ и в одной серии «сухой» иммерсии. Продолжительность воздействий, моделирующих микрогравитацию, составляла 21 ч как для АНОГ, так и для иммерсии. Воздействие начинали в 21.00 и завершали в 18.00 следующего дня. В одной серии АНОГ 8 испытуемых принимали нестероидный противовоспалительный препарат — кеторолак в стандартной однократной дозировке: 10 мг, per os (через 12 ч после начала воздействия микрогравитации).

Для определения ПБЧ методом термоалгометрии использовали экспериментальную установку «Альгометр». Для определения ПБЧ испытуемый прикладывал испытуемому нагреваемую пластину прибора к заранее выбранному участку тела. В нашем случае это была пальмарная поверхность кисти. Пластина равномерно нагревалась от  $20^\circ\text{C}$  со скоростью  $5,5^\circ\text{C}/\text{мин}$ . При появлении болевых ощущений испытуемый фиксировал температуру путем нажатия на кнопку пульта и исследователь прерывал воздействие. Фиксируемую температуру считали порогом болевой чувствительности.

Исследования проводили в фоновом периоде — за 30 мин до начала воздействия, через 12 ч после начала воздействия, но до приема обезболивающего

препарата, через 1 и 2 ч после приема препарата (13 и 14 ч модели) и через 20 ч после начала воздействия. Исследование проводили в контрольной и экспериментальной группах практически в одно и то же время.

Для определения концентрации кеторолака в плазме крови производили забор венозной крови через 15, 30, 45 мин, 1 ч, 1,5, 2, 3, 4, 6 и 8 ч. Кровь центрифугировали, плазму замораживали при температуре  $24^\circ\text{C}$  для последующей обработки.

Количественную оценку препарата в плазме крови проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ детектированием. Пробы для получения калибровочных кривых (спайки) готовили путем добавления известного количества стандарта определяемого соединения в интактную плазму крови. Количественный анализ проводили методом абсолютной калибровки с использованием программного обеспечения «Galaxy» компании «VARIAN».

Определяли и рассчитывали следующие параметры:

$C_{\text{max}}$  — максимальная концентрация кеторолака (нг/мл) в плазме крови;

$t_{\text{max}}$  — время достижения максимальной концентрации, ч;

MRT — среднее время удержания, ч;

$AUC_{0-8}$  — площадь под кривой «концентрация-время» для препарата в интервале от 0 до 8 ч (нг\*ч/мл для кеторолака);

$AUC_0$  — площадь под кривой «концентрация-время» для препарата в интервале от 0 до (нг\*ч/мл для кеторолака);

$T_{1/2}$  — период полувыведения препарата, ч;

MRT — время удержания препарата, ч.

Кроме того, усреднялись значения концентраций во все сроки наблюдения.

Все расчеты, представленные в виде таблиц и графиков, проводили с помощью автоматизированной компьютерной программы «Резольвента», STATISTICA 6.0, WORD, EXCEL и других специализированных компьютерных программ на ПК.

Верификация методики количественного определения препарата кеторолак в плазме методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ детектированием была проведена в соответствии с нормами GCP/CLP, руководством FDA для предприятий «Bioanalytical Method Validation» (май 2011 г.) По результатам проведенной верификации чувствительность метода составила 0,5 нг/мл. Воспроизводимость, точность и достоверность достигались во всем интервале концентраций. Степень извлечения из плазмы крови составила 84,6%.

Анализ фармакокинетических данных произведен в соответствии с Методическими рекомендациями по



проведению качественных клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов МЭ РФ (2008) и In vivo bioequivalence guidances (U.S. Pharmacopeia 24 'NF 19, National Formulary, Supplement 1090, 2000).

Программа эксперимента была одобрена комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ ИМБП РАН. Испытуемые подписывали информированное согласие на участие в эксперименте.

### Результаты и обсуждение

Для обработки результаты исследований с участием испытуемых были объединены из нескольких экспериментальных серий. Для оценки влияния АНОГ на ПБЧ оценивали показатели ПБЧ в точках: «Фон», «Утро (АНОГ)», «Утро (Контроль)», «Вечер (АНОГ)», «Вечер (Контроль)». Исследования в тех же точках проводили и в серии с «сухой» иммерсией. Поскольку распределение некоторых выборок отличалось от нормального, в качестве параметров описательной статистики использовали: число наблюдений, медиану выборки, нижнюю и верхнюю квартили (табл. 1).

Для оценки статистической значимости отличий между выборками данных использовали непараметрический критерий Манна—Уитни для независимых выборок. Статистически значимым считали уровень —  $p < 0,05$ .

При анализе полученных результатов, в первую очередь, обращает на себя внимание динамика ПБЧ в контрольной группе испытуемых. Она характеризуется значимым повышением порога в утренние часы.

По всей видимости, это связано с влиянием на температурную болевую чувствительность у человека циркадианных ритмов. В ряде работ указывается на различную по интенсивности реакцию живых организмов на любое воздействие в разное время суток.

На экспериментальных объектах различных эволюционных уровней, получены факты подтверждающие это положение [6]. Показано [7], что температуру 42° (горячая ванна) в утренние часы пациенты переносят без труда, в то время как после обеда чувствительность к температурным воздействиям резко возрастает и для переносимости подобной процедуры необходимо добавлять обезболивающие. Возможно, это связано с суточными колебаниями секреции кортикотропин-рилизинг-гормона (КРГ), а следовательно и адренкортикотропного гормона (АКТГ). Высвобождение АКТГ приводит к активации надпочечников и повышению в крови уровня кортизола. Этот циркадианный ритм в норме настроен так, чтобы обеспечивать увеличение кортизола в крови после засыпания. Во время сна уровень кортизола продолжает возрастать, достигая пика вскоре после пробуждения, затем постепенно падает до минимальных величин к концу дня и в ранние вечерние часы [8]. В экспериментальных работах на животных было показано, что гормоны конечного звена гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАКС) стимулируют нейроны центрального серого вещества среднего мозга, приводя к развитию анальгезии [9].

Недавние исследования Khan S.A. с соавторами показали, что суточные колебания болевой чувствительности могут быть связаны с колебаниями взаимодействия медиальной части префронтальной области коры головного мозга с цингулярной и окципитальной корой, вентромедиальной областью префронтальной коры, гиппокампом и миндалиной [10].

Таким образом, динамика ПБЧ в контрольной группе испытуемых, соответствует предполагаемой динамике этого показателя, исходя из суточных колебаний содержания глюкокортикоидов в крови здорового человека.

У испытуемых, подвергшихся воздействию АНОГ и «сухой» иммерсии, утренний подъем ПБЧ

Таблица 1

Сравнение динамики ПБЧ в группах АНОГ и «сухой» иммерсии

Точка	N набл.	Медиана	Нижняя квартиль	Верхняя квартиль	Сравнение с "Фон"	Сравнение с "Контроль" в той же точке
Фон	114	45,70	44,50	47,50	—	—
Утро (АНОГ)	40	45,25**	43,95	46,70	$p = 0,140183$	$p = 0,000031$
Утро (Иммерсия)	18	46,05**	45,10	46,50	$p = 0,630699$	$p = 0,000581$
Утро (Контроль)	36	47,70*	46,35	49,30	$p = 0,000121$	—
Вечер (АНОГ)	57	45,20*,**	43,80	46,40	$p = 0,020347$	$p = 0,000161$
Вечер (Иммерсия)	20	46,50	44,35	47,35	$p = 0,868579$	$p = 0,215078$
Вечер (Контроль)	36	47,05	45,60	47,75	$p = 0,062071$	—

Примечание. \* — изменения значимы по сравнению с объединенной точкой «ФОН»; \*\* — изменения значимы по сравнению с контрольной группой в данной точке.

отсутствует. Если предположить, что одним из ведущих факторов, определяющим уровень болевой чувствительности и, соответственно, ее порог у испытуемых, является уровень кортизола, то для объяснения выявленного факта существует два возможных механизма. Во-первых, нарушение циркадианных ритмов уровня глюкокортикоидов и отсутствие ночного подъема кортизола с выраженным максимумом в утренние часы. Второй механизм связан со снижением базового уровня кортизола, при сохраненной суточной динамике колебаний его концентрации в крови. Второй механизм, представляется маловероятным, поскольку по данным литературы экспериментальные исследования как в АНОГ, так и в «сухой» иммерсии, сопровождаются увеличением уровня глюкокортикоидов в крови [11—13]. Косвенно, первый механизм выявленных изменений подтверждает и тот факт, что мы не видим динамики ПБЧ через 20 ч АНОГ по сравнению с фоном. В то время как при снижении базового уровня кортизола можно было бы ожидать увеличения болевой чувствительности в вечерние часы, сопровождающееся снижением ПБЧ.

Кроме указанных выше механизмов, отсутствие физиологического утреннего подъема ПБЧ у испытуемых может быть вызвано нарушениями сна в непривычных (АНОГ, сухая иммерсия) условиях. Извест-

стен факт того, что депривация сна понижает порог болевой восприятия в ответ на термический раздражитель [14] и вполне может привести к нивелированию утреннего физиологического подъема ПБЧ до фоновых значений.

При оценке влияния на ПБЧ обезболивающих препаратов установлено, что кеторолак ни в контроле, ни в условиях АНОГ не влиял на болевую чувствительность при данном способе тестирования (табл. 2).

Значимое снижение ПБЧ в группе «Контроль + кеторолак» связано, скорее всего, с типичной суточной динамикой болевой чувствительности описанной выше.

В целом, отсутствие влияния кеторолака на болевую чувствительность вероятно обусловлено механизмом обезболивающего действия препарата [15], который ингибирует активность циклооксигеназы (ЦОГ-2) и синтез простагландинов, тем самым снижая выраженность воспалительной реакции. При оценке болевой чувствительности по нашей методике отсутствует воспалительный компонент в формировании болевого импульса и поэтому кеторолак не влияет на ПБЧ.

Фармакокинетические параметры кеторолака сравнивали в двух группах: «АНОГ» и «Контроль». Поскольку распределение в выборках было близким

Таблица 2

Сравнение динамики ПБЧ после приема кеторолака

			№ набл.	Медиана	Нижняя квартиль	Верхняя квартиль	Сравнение с "До приема препарата"
АНОГ	"Плацебо"	До приема препарата (АНОГ)	8	45,95	43,75	48,35	—
		1 ч после приема препарата (АНОГ)	8	45,55	43,80	47,55	p = 0,78
		2 ч после приема препарата (АНОГ)	8	45,90	43,95	48,55	p = 0,35
	"Кеторолак"	До приема препарата (АНОГ)	8	45,25	43,65	47,95	—
		1 ч после приема препарата (АНОГ)	8	45,30	42,60	48,20	p = 0,89
		2 ч после приема препарата (АНОГ)	8	44,90	43,00	47,40	p = 0,58
Контроль	"Плацебо"	До приема препарата (АНОГ)	8	47,00	45,00	49,05	—
		1 ч после приема препарата (АНОГ)	8	46,10	43,85	48,25	p = 0,11
		2 ч после приема препарата (АНОГ)	8	47,10	43,85	47,70	p = 0,12
	"Кеторолак"	До приема препарата (АНОГ)	8	46,20	45,00	49,65	—
		1 ч после приема препарата (АНОГ)	8	44,90*	43,40	46,80	<b>p = 0,02</b>
		2 ч после приема препарата (АНОГ)	8	44,30	42,50	47,40	p = 0,05

Примечание. \* — изменения значимы

Фармакокинетические параметры кеторолака

Параметр	АНОГ		Контроль		Уровень значимости изменений
	Среднее	Стандартное отклонение	Среднее	Стандартное отклонение	
$C_{\max}$ , нг/мл	937,0	130,11	1041,2	177,07	0,123486
$T_{\max}$ , ч	1,3	0,33	1,4	0,37	0,916512
$AUC_{0-8}$ , нг*ч/мл	2398,11*	259,82	3217,6	538,69	<b>0,017291</b>
$AUC_{0-}$ , нг*ч/мл	2745,68*	398,05	3749,42	654,62	<b>0,017291</b>
$T_{1/2}$ , ч	2,32	0,304	3,17	0,724	0,128191
MRT, ч	2,8	0,7	4,08	0,887	0,068704
$C_{\max}/AUC_{0-8}$ , ч <sup>-1</sup>	0,3974*	0,0698	0,3259	0,0419	<b>0,049951</b>

Примечание. \* — изменения значимы

к нормальному, в качестве параметров описательной статистики использовали выборочное среднее значение и стандартное отклонение (табл. 3).

Для определения уровня значимости изменений использовали критерий Вилкоксона для зависимых выборок. Статистически значимым считали уровень —  $p < 0,05$ .

При анализе фармакокинетики кеторолака по группам мы видим, что различия в средней максимальной концентрации ( $C_{\max}$ ) незначительны. Среднее время достижения максимальной концентрации ( $T_{\max}$ ) практически не отличается.

Тем не менее, скорость всасывания ( $C_{\max}/AUC_{0-8}$ )\* препарата достоверно выше в условиях АНОГ, чем в контрольной группе.

Значения времени удержания (MRT) кеторолака в условиях АНОГ существенно меньше, чем в контроле, соответственно и время полувыведения препарата ( $T_{1/2}$ ) в условиях модели невесомости меньше. Однако эти изменения не достигают заданного уровня значимости.

Среднее значение  $AUC_{0-8}$  обозначающее площадь под кривой «Концентрация-время» в АНОГ было значимо меньше, чем в контрольной группе. Степень относительной биологической доступности, определяемая отношением  $AUC_{0-t}$  была статистически значимо ниже в условиях АНОГ и составила 74,5% от приема в обычных условиях.

При определении относительной биологической доступности кеторолака по отношению показателя  $AUC_{0-}$  \* в условиях АНОГ, он также составил 75%.

### Заключение

Таким образом, при проведении эксперимента получены данные, подтверждающие влияние моделирования факторов космического полета на болевую чув-

ствительность. Механизм повышения болевой чувствительности в утренние часы, по всей видимости, связан с изменениями циркадианных колебаний уровня кортизола в условиях «микрогравитации». Возможно определенную роль в изменениях ПБЧ играет и снижение качества сна в условиях эксперимента. Отсутствие влияния кеторолака на ПБЧ связано с механизмом его обезболивающего действия. Тем не менее, при использовании кеторолака в качестве обезболивающего средства при воспалительных заболеваниях в условиях космического полета нельзя исключить увеличения скорости всасывания препарата и снижения его относительной биодоступности и времени удержания в плазме крови в условиях невесомости.

### Список литературы

1. Решетняк В.К., Кукушкин М.Л., Гурко Н.С. Значение корково-подкорковых структур мозга в восприятии острой и хронической боли. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 58(4): 96-110.
2. Erpelding N., Moayed M., Davis K.D. Cortical thickness correlates of pain and temperature sensitivity. *Pain*. 2012; 153:1602-9.
3. Баранов М.В., Перфилов Д.В., Ковалев А.С. и др. Изменения порога болевой реакции у крыс после 21-суточного вывешивания. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2012; 46(4): 53-55.
4. Ковачевич И.В., Репенкова Л.Г., Кондратенко С.Н. Исследование особенностей фармакологического воздействия в условиях длительного космического полета «Фарма». В кн.: *Международная космическая станция, Российский сегмент. Космическая биология и медицина*. Москва: «Научная книга»; 2011, 1: 229-35.
5. Синтрон Н.М., Путча Л. Фармакокинетика в полете. В кн.: *Антипов В.В., Григорьев А.И., Лич Хантун К., ред. Человек в космическом полете*. Москва: «Наука»; 1997, 3 кн. 2: 469-86.
6. Степанова С.И. Биоритмологические аспекты проблемы адаптации. Москва: «Наука»; 1986.
7. Lampert D.H. Rhythmische Reizbarkeitsanderung des Organismus und ihre Bedeutung fur die Krankenbehandlung.

— In: Verh.3. *Konf. Intern. Ges. biol. Rhythmus-Forschung*. Stockholm, 1953: 141-4.

8. Греннер Д. Гормоны коры надпочечников. В кн.: *Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В., ред. Биохимия человека*. Москва: «Мир»; 1993, 2: 205-20.

9. Ярушкина Н.И. Роль гормонов гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы в регуляции болевой чувствительности. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2007; 93(11): 1252-62.

10. Khan S.A., Keaser M.L., Meiller N.F., Semnowcz D.A. Altered structure and function in the hippocampus and medial prefrontal cortex in patients with burning mouth syndrome. *Pain*. 2014; 155: 1472-80.

11. Крупина Т.Н., Михайловская Г.П., Тизул А.Я. и др. В кн.: Адаптация к мышечной деятельности и гипокинезии. Новосибирск, 1970: 94-6.

12. Крупина Т.Н., Тизул А.Я., Баранова В.П. и др. В кн.: Адаптация к мышечной деятельности и гипокинезии. Новосибирск, 1970: 96-98.

13. Nastassia M. Navasiolova, Marc-Antoine Custaud, Elena S. Tomilovskaya et. al. Long-term dry immersion: review and prospects. *Eur. J. Appl. Physiol*. 2011; 111: 1235-60.

14. Решетняк В.К. Взаимовлияние боли и сна. *Российский журнал боли*. 2013, 2: 42-8.

15. Бунятян А.А., Мизиков В.М. Рациональная фармакоанестезиология. Руководство для практикующих врачей. Москва: Литтера; 2006.

Поступила 06.04.15

## References

1. Reshetnyak V.K., Kukushkin M.L., Gurko N.S. The importance of the cortex and subcortical structures of the brain in the perception of acute and chronic pain. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2014; 58(4): 96-110. (in Russian)

2. Erpelding N., Moayed M., Davis K.D. Cortical thickness correlates of pain and temperature sensitivity. *Pain*. 2012; 153:1602-9.

3. Baranov M.V., Perfilov D.V., Kovalev A.S. et al. Changes in the threshold pain response in rats, after 21-day suspension. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina*. 2012; 46(4): 53-5. (in Russian)

4. Kovachevich I.V., Repenkova L.G., Kondratenko S.N. Research of features of the pharmacologic effects in long-term space flight «Pharma». V kn.: *Mezhdunarodnaya kosmicheskaya stantsiya, Rossiyskiy segment. Kosmicheskaya biologiya i meditsina*. Moskva: «Nauchnaya kniga»; 2011, 1: 229-35. (in Russian)

5. Sintron N.M., Putcha L. Pharmacokinetics in flight. V kn.: *Antipov V.V., Grigor'ev A.I., Lich Khantun K., red. Chelovek v kosmicheskom polete*. Moskva: «Nauka»; 1997, 3 kn. 2: 469-86. (in Russian)

6. Stepanova S.I. Biorhythmological aspects of adaptation. Moskva: «Nauka»; 1986. (in Russian)

7. Lampert D.H. Rhythmische Reizbarkeitsanderung des Organismus und ihre Bedeutung fur die Krankenbehandlung. — In: Verh.3. *Konf. Intern. Ges. biol. Rhythmus-Forschung*. Stockholm, 1953: 141-4.

8. Grenner D. Hormones of the adrenal cortex. V kn.: *Marri R., Grenner D., Meyes P., Roduell V., red. Biokhimiya cheloveka*. Moskva: «Mir»; 1993, 2: 205-20. (in Russian)

9. Yarushkina N.I. The role of hormones of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in the regulation of pain sensitivity. *Ros. fiziol. zhurn. im. I.M. Sechenova*. 2007; 93(11): 1252-62. (in Russian)

10. Khan S.A., Keaser M.L., Meiller N.F., Semnowcz D.A. Altered structure and function in the hippocampus and medial prefrontal cortex in patients with burning mouth syndrome. *Pain*. 2014; 155: 1472-80.

11. Krupina T.N., Mikhaylovskaya G.P., Tizul A.Ya. i dr. V kn.: *Adaptatsiya k myshechnoy deyatel'nosti i gipokinezii*. Novosibirsk, 1970, S. 94-6. (in Russian)

12. Krupina T.N., Tizul A.Ya., Baranova V.P. i dr. V kn.: *Adaptatsiya k myshechnoy deyatel'nosti i gipokinezii*. Novosibirsk, 1970, S. 96-8. (in Russian)

13. Nastassia M. Navasiolova, Marc-Antoine Custaud, Elena S. Tomilovskaya et. al. Long-term dry immersion: review and prospects. *Eur. J. Appl. Physiol*. 2011; 111: 1235-60.

14. Reshetnyak V.K. Interference of pain and sleep. *Rossiyskiy zhurnal boli*. 2013, 2: 42-8. (in Russian)

15. Bunyatyan A.A., Mizikov V.M. Rational farmakoanesteziologiya. *Rukovodstvo dlya praktikuyushchikh vrachev*. Moskva: Littera; 2006. (in Russian)

Received 06.04.15

## Сведения об авторах:

Ковалев Александр Сергеевич, вед. инженер опытно-конструкторской лаб. НИИ космической медицины ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, e-mail: spacemedinstitute@yandex.ru

Перфилов Дмитрий Владимирович, мл. науч. сотр. ГНЦ Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем РАН, e-mail: lab038@yandex.ru

Черногоров Роман Вячеславович, младший научный сотрудник Государственного научного центра Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем РАН; e-mail: lab038@yandex.ru

Репенкова Людмила Георгиевна, к.м.н., вед. науч. сотр. ГНЦ Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем РАН, e-mail: lab038@yandex.ru



Зарубина И.В., Федорова О.В., Шабанов П.Д.

## Анализ эффектов тропалгина при воспалительной боли у крыс с различным болевым порогом

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, 194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, 6

У крыс Вистар определяли индивидуальную болевую чувствительность в тесте отдергивания хвоста (*tail-flick*) при воздействии на него фокусированного теплового луча. Животные с латентным периодом отдергивания хвоста менее 5 с считались высокочувствительными к боли (ВЧ), более 10 с — низкочувствительными (НЧ) к боли. У них изучали эффекты нового неопиоидного анальгетика тропалгина, вводимого внутривнутрибрюшинно в дозе 2 мг/кг (ЕД<sub>50</sub>). Тропалгин проявлял выраженное анальгетическое действие при асептическом воспалении (формалиновый тест), сопоставимое с эффектами метамизола натрия (50 мг/кг) и диклофенака натрия (7 мг/кг). Тропалгин не менял индивидуальной болевой чувствительности у ВЧ и НЧ крыс без воспаления. При моделировании асептического воспаления тропалгин (2 мг/кг) уменьшало выраженность болевого поведения у крыс в обе фазы воспалительной реакции. В группе ВЧ к боли крыс суммарное время болевой поведенческой реакции снижалось на 53% в фазу острой боли и на 58% в фазу тонической боли. У НЧ к боли крыс время вылизывания воспаленной лапы уменьшалось в первую фазу на 42%, во вторую фазу на 66%. Предполагается, что в основе анальгетического эффекта тропалгина лежит его способность высвободить эндогенный аденозин в пуринергических нейронах, ранее продемонстрированная для подобных соединений тропина.

**Ключевые слова:** болевая чувствительность, острая воспалительная боль, анальгетики, тропалгин, метамизол натрия, диклофенак натрия

Zarubina I.V., Fedorova O.V., Shabanov P.D.

## Analysis of tropalgin effects in an inflammation pain model in rats with different pain threshold

Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg 194044, Acad. Lebedev street, 6, i.v.zarubina@inbox.ru

Individual pain sensitivity of male Wistar rats was determined in a tail-flick model after action of focused thermal ray (flick) on tail. Rats with latency less than 5 sec were qualified as high sensitive (HS) to pain, more than 10 sec as low sensitive (LS) to pain. Effects of a new nonopioid analgetic tropalgin 2 mg/kg (ED<sub>50</sub>) i.p. was studied in both groups of rats. Tropalgin was effective as an analgetic in aseptic inflammation model (formaldehyde test). The analgetic effects of tropalgin were same as after administration of methamizol sodium (50 mg/kg) or diclofenac sodium (7 mg/kg). Tropalgin did not change individual pain sensitivity in both HS and LS rats without inflammation. In HS to pain rats, the common time of pain behavioral reactions was decreased by 53% in an acute phase of pain and by 58% in a tonic phase of pain in inflammation pain model. In LS to pain rats, the time of leaking of inflamed paw was decreased by 42% in the first phase and by 66% in the second phase. We suggest that analgetic effect of tropalgin is connected with adenosine release in purinergic neurons that has been demonstrated earlier for drugs of tropin structure.

**Key words:** pain sensitivity, acute inflammation pain, analgetics, tropalgin, methamizol sodium, diclofenac sodium

Боль относится к значимым медико-социальным проблемам, поскольку существенно изменяет поведение человека. Острая и хроническая боль приводит к различным функциональным нарушениям основных систем организма (кровообращения, дыхательной, пищеварительной и др.), нарушает процессы регуляции разных видов чувствительности и формирует особый

тип болевого поведения [1]. Хорошо известно, что реакции человека и животных на любые экстремальные воздействия не одинаковы, и в популяции обнаруживаются устойчивые и чувствительные особи к действию стрессорных факторов. При этом устойчивость определяется факторами индивидуальной восприимчивости к экстремальным факторам среды [2, 3]. Порог болевого ощущения также формируется на основе генетически детерминированного взаимодействия ноцицептивной и антиноцицептивной систем организма и является эволюционно выработанной жизненно важной

**Для корреспонденции:** Зарубина Ирина Викторовна, д.биол.н., проф., ст. науч. сотр. каф. фармакологии ВМА им. С.М. Кирова МО РФ, e-mail: i.v.zarubina@inbox.ru

константой, не одинаковой у разных индивидуумов [4, 5]. Ранее нами показано, что крысы с низкой чувствительностью к боли обладают большей устойчивостью к тяжелой травме и иммобилизационному стрессу, чем высокочувствительные к боли животные [6]. Это подтверждает важное значение индивидуальной болевой чувствительности при выборе эффективной и безопасной терапии болевых синдромов. Патогенез боли, вызванной воспалением или повреждением тканей, обусловлен непосредственным раздражением или сенсibilизацией ноцицептивных нервных окончаний медиаторами воспаления. На периферические и соматические компоненты боли такие, как воспаление, отек вследствие раздражения болевых рецепторов прямо действуют нестероидные противовоспалительные средства (НПВП), механизм действия большинства которых связан с угнетением активности циклооксигеназы в спинном мозге и на периферии, а также торможением избыточной продукции медиаторов воспаления [7]. Длительное применение этой группы препаратов приводит к развитию таких нежелательных явлений, как гастропатия, кардиоваскулярные нарушения, гепато-ренальные дисфункции и др. Поэтому поиск эффективных анальгетиков нового поколения с неопиоидным механизмом действия остается актуальной медицинской проблемой.

*Цель исследования* — изучение анальгетического действия нового производного тропина — тропалгина при острой асептической воспалительной реакции у животных с различной болевой чувствительностью.

### Методика

Опыты выполнены на половозрелых крысах-самцах Вистар массой 160—180 г, полученных из питомника Рапполово РАМН (Ленинградская область). Животных содержали в виварии в стандартных условиях освещения и питания при свободном доступе к воде и пище. Исследования осуществляли в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 2003 г. №267), требованиями Международной ассоциации по изучению боли и Директивы Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС). Работа одобрена локальным комитетом по этике при Военно-медицинской академии им. С.М.Кирова.

Индивидуальную болевую чувствительность определяли в тесте отдергивания хвоста (tail-flick) при воздействии на него фокусированного теплового луча [8]. Латентный период отдергивания хвоста регистрировали с помощью оптоэлектронного анальгезиметра ТФ-003 (Россия). Мощность лампы осветителя составляла 50 Вт, сила тока 3 мА, точность регистрации — 0,1 с. Животные с болевым порогом менее 5 с

(временем задержки отдергивания хвоста) считались высокочувствительными к боли (ВЧ), более 10 с — низкочувствительными (НЧ) к боли.

Животным внутрибрюшинно вводили тропалгин в дозе 2 мг/кг (синтезирован в отделе нейрофармакологии им. С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург). Через 20 мин моделировали острое асептическое воспаление. В качестве хемотропной модели неспецифической асептической воспалительной реакции использовали «формалиновый тест», являющийся международно признанной процедурой для скрининга средств с потенциальной анальгетической активностью [9]. Для формирования боли крысам интраплаттарно (в подушечку задней лапы) вводили 20 мкл 4% водного раствора формалина. Интенсивность болевой реакции оценивали в течение 60 мин по продолжительности суммарного времени вылизывания инъецированной лапы и общему числу спонтанных вздрагиваний.

Коэффициент анальгезии рассчитывали по известной формуле [10]:

$$A = (P_k - P_o) / P_k * 100\%, \text{ где}$$

$P_k$  — количество регистрируемых поведенческих реакций в контроле;

$P_o$  — количество регистрируемых поведенческих реакций в опытной группе;

$A$  — коэффициент анальгезии.

Препаратами сравнения служили нестероидные противовоспалительные средства — метамизол натрия (анальгин, АО «Софарма», София, Болгария) в дозе 50 мг/кг и диклофенак натрия (Хемофарм, Сербия) в дозе 7 мг/кг, вводимые внутрибрюшинно. Контрольные животные получали эквивалентный объем физиологического раствора.

Для статистической обработки полученных количественных данных применяли пакеты программ SPSS Sigma Stat 3.0 и Minitab 14. В качестве статистических критериев использовали традиционные показатели описательной статистики. Для сравнения контрольной и экспериментальных групп использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, а также критерии попарных сравнений групп Стьюдента—Ньюмена—Кейлса и Данна. Из непараметрических критериев использовали критерий Краскала—Уоллиса для сравнения групп. Для оценки соответствия распределений случайных величин гауссовым применяли критерий нормальности Колмогорова—Смирнова.

### Результаты и обсуждение

Болевая реакция при остром воспалении у животных, развивающаяся в ответ на интраплаттарное введение водного раствора формалина, состоит из 2 фаз:

1-я фаза характеризует острую боль, длится в течение 5 мин и связана в основном с прямой активацией тонких немиелиновых С-волокон, передающих импульсацию от болевых рецепторов, 2-я фаза относится к тонической боли и продолжается в течение 1 ч и более. Во 2-ю фазу развивается воспалительный процесс в периферических тканях и изменяются функции нейронов задних рогов серого вещества спинного мозга, где расположены нейроны болевых восходящих путей. В течение этих фаз у животных наблюдается характерное болевое поведение: полизывание поврежденной лапы и вздрагивания тела или воспаленной конечности. Первые реакции относятся к супрасегментарным механизмам интегративной болевой реакции — дискриминативным, эмоциональным и моторным. Болевые вздрагивания служат признаком интенсивности спинальных ноцицептивных рефлексов [9].

В контрольной группе животных в 1-ю фазу острой болевой реакции были выражены оба признака болевого поведения. Однако у ВЧ к боли крыс количество общих болевых поведенческих реакций было больше, чем в группе НЧ животных. Суммарное время вылизывания инъецированной лапы у ВЧ животных превышало таковое у НЧ крыс на 63%, во 2-ю фазу, позволяющую оценить тоническую боль — на 33% (табл. 1).

Во 2-ю фазу воспалительной реакции у животных увеличивалось количество болевых вздрагиваний тела и (или) поврежденной конечности, что также было более выражено в группе ВЧ к боли крыс.

Различия в поведенческих реакциях у животных с различной чувствительностью к боли зависят от вовлечения механизмов реализации стресс-лимитирующих (опиоидных) систем организма. Они представлены главным образом скоплением энкефалинергиче-

ских нейронов в области серого околоспинального вещества головного мозга и имеют восходящие и нисходящие (в спинной мозг) проекции [11]. Активация нисходящих энкефалинергических нейронов меняет афферентные потоки болевой чувствительности и, следовательно, повышает пороги боли. Этот феномен, по-видимому, лежит в основе индивидуально сниженной болевой чувствительности. Термо-, хемо-, волюмен-, тактильные рецепторы кожи и внутренних органов в ответ на болевой раздражитель запускают ноцицептивные системы мозга, обеспечивая проведение болевого импульса и формирование реакции на боль. Также они активируют важнейшие системные реакции организма по поддержанию гомеостаза в новых условиях, в том числе системы кровообращения, состава крови, дыхания, метаболизма. Эти системы формируют быструю адаптацию к экстремальным ситуациям, в том числе моделируемое в наших исследованиях острое асептическое воспаление. Очевидно, нейрхимическое звено, связывающее эти два явления, вовлекает сходные афферентные триггеры — активацию ноцицепторов при реализации боли и активацию гомеостатических реакций через разные рецепторы, включая ноцицепторы.

У ВЧ животных, получавших метамизол натрия, выраженность болевой реакции в 1-ю фазу воспаления снижалась на 37%, у НЧ крыс — на 28%. Во 2-ю фазу воспаления суммарное время болевой поведенческой реакции снижалось у ВЧ крыс на 19%, у НЧ крыс — на 20%. На фоне действия диклофенака натрия у ВЧ животных болевые реакции в 1-ю фазу воспаления уменьшались на 23%, у НЧ к боли крыс — на 12%. Во 2-ю фазу воспалительной реакции выраженность болевых реакций снижалась у ВЧ крыс на 47%, у НЧ крыс — на 67% (табл. 1).

Таблица 1

Эффекты тропалгина при асептическом воспалении ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )

Группы животных		Общая болевая реакция, с	1-я фаза воспаления		2-я фаза воспаления	
			Суммарное время облизывания лап, с	Количество вздрагиваний	Суммарное время облизывания лап, с	Количество вздрагиваний
Контроль	ВЧ	532,3	130,3 ± 4,6	50 ± 4,1	402 ± 17	127 ± 2,5
	НЧ	382,9 <sup>#</sup>	79,7 ± 6,2 <sup>#</sup>	38 ± 3,7 <sup>#</sup>	303,2 ± 14,5 <sup>#</sup>	87 ± 2,8 <sup>#</sup>
Тропалгин, 2 мг/кг	ВЧ	296,5	61,7 ± 4,1*	32 ± 2,3*	234,8 ± 26,6*	55 ± 1,9*
	НЧ	134,94 <sup>#</sup>	33,2 ± 3,0**	22 ± 1,2**	101,7 ± 9,9**	28 ± 1,8**
Метамизол натрия, 50 мг/кг	ВЧ	407,7	82,3 ± 1,4**	47 ± 2,3	324,8 ± 10**	93 ± 4,4*
	НЧ	299,5 <sup>#</sup>	58,5 ± 1,6**	30 ± 3,4 <sup>#</sup>	242,8 ± 4,4**	71 ± 3,9**
Диклофенак, 7 мг/кг	ВЧ	313,3	100,2 ± 1,4**	45 ± 2,3	212,7 ± 3,4**	86 ± 2,7*
	НЧ	169,0 <sup>#</sup>	70,5 ± 2,5**	27 ± 1,6**	98,3 ± 1,8**	68 ± 3,0**

Примечание. \* — значимые различия ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем; # — между группами животных с различной чувствительностью к боли.

Введение животным с разной чувствительностью к боли (но без воспаления), тропалгина в минимальной эффективной дозе 2 мг/кг, вызывающей аналгезию у 50% животных ( $E_{D_{50}}$ ), перед повторением теста отдергивания хвоста не изменяло характера их индивидуальной болевой чувствительности, она сохранялась на уровне исходной (ВЧ или НЧ), то есть препарат не проявляет антиболевого действия при отступлении включения ноцицептивной системы. При моделировании асептического воспаления введение тропалгина в дозе 2 мг/кг уменьшало выраженность болевого поведения у крыс в обеих фазах воспалительной реакции. В группе ВЧ к боли крыс суммарное время болевой поведенческой реакции снижалось на 53% в фазу острой боли и на 58% в фазу тонической боли. У НЧ к боли крыс время вылизывания воспаленной лапы уменьшалось в 1-ю фазу на 42%, во 2-ю фазу на 66%. На фоне действия тропалгина количество вздрагиваний в 1-ю фазу воспалительной реакции уменьшалось в группе ВЧ животных на 36%, у НЧ крыс на 57%. Более выраженное уменьшение интенсивности этого паттерна болевого поведения наблюдалось во 2-ю фазу воспалительной реакции. Количество спонтанных вздрагиваний уменьшалось у ВЧ крыс на 57%, у НЧ крыс на 68%. Следовательно, тропалгин проявляет аналгетическое действие при асептическом воспалении. Рассчитанный коэффициент аналгезии тропалгина на модели хемогенной асептической воспалительной реакции при острой боли у ВЧ крыс составлял 53%, у НЧ крыс — 58%. При тонической боли коэффициент аналгезии тропалгина равнялся 42% в группе ВЧ крыс и 66% у НЧ животных (табл. 2).

Значения коэффициента аналгезии тропалгина при асептическом воспалении у ВЧ и НЧ к боли крыс

в 1-ю и 2-ю фазы воспалительной реакции были сопоставимы с коэффициентами аналгезии диклофенака натрия и превышали значения коэффициента при введении метамизола натрия. Это предполагает возможность наличия у тропалгина как аналгетического, так и противовоспалительного действия.

Способность метамизола натрия и диклофенака натрия ингибировать активность циклооксигеназы 2-го типа (воспалительной) обеспечивает классическую триаду в их эффектах: аналгетическое, противовоспалительное и жаропонижающее действие [7]. Механизм действия тропалгина до конца не изучен. Известно, что производные тропина способны блокировать Н-холинорецепторы и оказывать аденозинолиберирующее действие [12]. Возможно активация эндогенных антиболевых систем, в частности, аденозина, лежит в основе аналгетического действия тропалгина.

Таким образом, тропалгин проявляет выраженное аналгетическое действие при асептической воспалительной реакции у животных с различной болевой чувствительностью. Для достижения оптимального аналгетического действия фармакологических средств необходимо учитывать особенности индивидуальной болевой чувствительности. Персонализированный подход в клинической практике позволит повысить эффективность обезболивания конкретных групп больных.

## Выводы

1. Введение тропалгина интактным животным, разделенным по их индивидуальной чувствительности к боли, не изменяет их исходный уровень болевого порога в тесте отдергивания хвоста.

Таблица 2

Коэффициент аналгезии препаратов при асептическом воспалении

Препарат	Фазы воспаления	Группы животных	Коэффициент аналгезии
Метамизол натрия, 50 мг/кг	1	ВЧ	37
		НЧ	28
	2	ВЧ	19
		НЧ	20
Диклофенак, 7 мг/кг	1	ВЧ	23
		НЧ	12
	2	ВЧ	47
		НЧ	67
Тропалгин, 2 мг/кг	1	ВЧ	53
		НЧ	58
	2	ВЧ	42
		НЧ	66



2. При боли, вызванной асептическим воспалением, тропалгин проявляет анальгетическое действие, сопоставимое по величине с эффектами метамизола натрия и диклофенака натрия, но он более активен, поскольку действует в меньшей дозе ( $ED_{50}$  2 мг/кг).

3. Вероятным механизмом анальгетического действия тропалгина при остром асептическом воспалении является способность высвобождать эндогенный аденозин в пуринергических нейронах.

### Список литературы

1. Kemler M.A. Spinal cord stimulation in patients with chronic reflex sympathetic dystrophy. *New Engl. J. Med.* 2000; Vol. 142: 370-80.
2. Ростовцева Е.В., Бондарева Э.А., Агапов И.И. Молекулярно-генетические аспекты индивидуальных различий в болевомощении и терморегуляции. *Физиология человека.* 2009; 35(1): 130-40.
3. Kim H., Neubert J.K., San Miguel A. et al. Genetic influence on variability in human acute experimental pain sensitivity associated with gender, ethnicity and psychological temperament. *Pain.* 2004; 109(3): 488-90.
4. Пшенникова М.Г., Смирнова В.С., Грифова В.Н., Шимкович М.В. и др. Устойчивость к развитию невропатического болевого синдрома у крыс линии Август и популяции Вистар, обладающих разной врожденной устойчивостью к стрессовому воздействию. *Боль.* 2008; 2:13-6.
5. Turk D.C., Dworkin R.H., Allen R.R. et al. Core outcome domains for chronic pain clinical trials: IMMPACT recommendations. *Pain.* 2003; 106(3):337-45.
6. Зарубина И.В., Шабанов П.Д. Значение болевой чувствительности для устойчивости к иммобилизационному стрессу. *Патофизиология и экспериментальная терапия.* 2012; 1: 44-8.
7. Давыдов А.Т., Тюкавин А.И., Резванцев М.В., Конончук В.В., Шабанов П.Д. Фантомная боль, роль и место различных методов лечения фантомно-болевого синдрома. *Обзоры по клин. фармакологии и лек. терапии.* 2014;12(1): 35-58.
8. Kawakita K., Funakoshi M. A quantitative study on the tail flick test in the rat. *Physiol. Behav.* 1987; 39(2): 235-40.
9. Janicki P.K., Parris W. Animal models for pain research. *Current Pain and Headache Reports.* 1997; Vol. 1: 197-204.
10. Кузьмин А.В., Звартау Э.Э. *Сравнительная оценка анальгетического потенциала и наркологической безопасности центральных анальгетиков в опытах на мышах. Эксперим. и клин. фармакол. болеутоляющих средств.* Под ред. Ю.Д.Игнатова. СПб., 1998.
11. Волчков В.А., Игнатов Ю.Д., Страшнов В.И. *Болевые синдромы в анестезиологии и реаниматологии.* М. Медпресс-информ. 2006.

12. Сердюк С.Е., Гмиро В.Е. Периферически действующие медиаторы боли и анальгезии потерцируют центральное анальгезирующее действие фентанила и анальгина у крыс. *Рос. физиол. журнал им. И.М.Сеченова.* 2012; 98(3): 325-30.

Поступила 06.04.15

### References

1. Kemler M.A. Spinal cord stimulation in patients with chronic reflex sympathetic dystrophy. *New Engl. J. Med.* 2000; Vol. 142:370-80.
2. Rostovtseva E.V., Bondareva E.A., Agapov I.I. Molecular and genetic aspects of individual difference in pain perception and thermoregulation. *Human Physiology.* 2009; 35(1): 130-40. (in Russian)
3. Kim H., Neubert J.K., San Miguel A. et al. Genetic influence on variability in human acute experimental pain sensitivity associated with gender, ethnicity and psychological temperament. *Pain.* 2004;109(3):488-90.
4. Pshennikova M.G., Smirnova V.S., Grifova V.N., Shimkovich M.V. et al. Resistance to neuropathic pain syndrome development in August rats and Wistar line possessing different innate resistance to stress exposure. *Pain.* 2008;(2):13-6. (in Russian)
5. Turk D.C., Dworkin R.H., Allen R.R. et al. Core outcome domains for chronic pain clinical trials: IMMPACT recommendations. *Pain.* 2003; 106(3): 337-45.
6. Zarubina I.V., Shabanov P.D. Significance of pain sensitivity for resistance to immobilization stress. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya.* 2012; 1: 44-8. (in Russian)
7. Davydov A.T., Tyukavin A.I., Rezvantsev M.V., Kononchuk V.V., Shabanov P.D. Phantom pain, role and place of different methods of treatment of phantom-pain syndrome. *Obz. Klin. Farmakol. i Lek. Terapii.* 2014;12(1): 35-58. (in Russian)
8. Kawakita K., Funakoshi M. A quantitative study on the tail flick test in the rat. *Physiol. Behav.* 1987; 39(2): 235-40.
9. Janicki P.K., Parris W. Animal models for pain research. *Current Pain and Headache Reports.* 1997; 1: 197-204.
10. Kuz'min A.V., Zvartau E.E. *Comparative assessment of analgetic potential and narcological safety of the central analgetics in the experiments on mice.* Ed. by Y.D. Ignatov. St. Petersburg, 1998. (in Russian)
11. Volchkov V.A., Ignatov Y.D., Strashnov V.I. *Pain syndromes in anesthesiology and reanimatology.* Moscow, Medpress-inform; 2006. (in Russian)
12. Serdyuk S.E., Gmiro V.E. Peripherally acting pain transmitters and analgesia potentiate central analgetic action of fentanyl and analgin in rats. *Sechenov Rus. Physiol J.* 2012; 98(3):325-30. (in Russian)

Received 06.04.15

### Сведения об авторах:

Федорова Ольга Владимировна, соискатель каф. фармакологии ВМА им. С.М. Кирова МО РФ  
Шабанов Петр Дмитриевич, д.м.н., проф., зав. каф. ВМА им. С.М. Кирова МО РФ, e-mail: pdshabanov@mail.ru

Долгих В.Т.<sup>1</sup>, Епифанов В.Г.<sup>2</sup>

## **Фибрилляция предсердий и состояние вегетативной нервной системы: особенности тактики и оказания медицинской помощи на догоспитальном этапе**

<sup>1</sup> — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Омский государственный медицинский университет Минздрава России», 644043, Омск-43, ул. Ленина, 12

<sup>2</sup> — Бюджетное учреждение здравоохранения Омской области «Станция скорой медицинской помощи», Россия, 644099, Омск-99, ул. Косарева, 117

*Проведено сравнительное ретроспективное изучение результатов оказания неотложной медицинской помощи 1051 больного с приступами фибрилляции предсердий и дана оценка тактики их ведения на догоспитальном этапе. Установлено, что возникновение приступа фибрилляции предсердий на догоспитальном этапе сопровождается выраженным вегетативным дисбалансом. Антиаритмическая терапия фибрилляции предсердий с применением диазепама способствует быстрому уменьшению симпатикотонии на догоспитальном этапе и повышает эффективность лечения в первый час наблюдения за больным.*

**Ключевые слова:** фибрилляция предсердий, неотложная медицинская помощь на догоспитальном этапе, вегетативный тонус

Dolgikh V.T., Epifanov V.G.

## **Atrial fibrillation and condition of vegetative nervous system: features of tactics and medical aid rendering at the pre-hospital stage**

*Comparative retrospective study of emergency action results for 1051 patients with atrial fibrillation attacks and their management tactics assessment at a pre-hospital stage was done. It was found that occurrence of an attack of atrial fibrillation at a pre-hospital stage is accompanied expressed vegetative imbalance. Antiarrhythmic therapy using diazepam for atrial fibrillation promotes fast decrease of sympathicotonia at a pre-hospital stage and improves treatment efficacy in the first hour of observation of patients.*

**Key words:** atrial fibrillation, emergency action at a pre-hospital stage, vegetative tonicity

Фибрилляция предсердий (ФП) — самое распространенное нарушение сердечного ритма, встречающееся в клинической практике, в том числе и в практике врача скорой медицинской помощи. Она является причиной приблизительно трети госпитализаций в связи с нарушением ритма сердца [1]. В последние два десятилетия частота госпитализаций пациентов с ФП увеличилась в 2—3 раза [2], что привело, с одной стороны, к удорожанию их лечения, а с другой — к разработке новых способов терапии этой категории пациентов [3].

Среди обратившихся за скорой медицинской помощью больных с сердечно-сосудистой патологией пациенты с приступами ФП составляют около 10%.

Распространенность фибрилляции предсердий в общей популяции составляет 0,5%, увеличиваясь с возрастом и при наличии органической патологии сердца, достигает 6% и более среди лиц старше 80 лет [4].

У 23,3% больных с наличием пароксизмальной и у 28,4% больных с постоянной формами ФП имеет место усиление уровня клинической тревоги и депрессии по сравнению с больными, не имеющими нарушений сердечного ритма. Доказана важная роль психо-вегетативных расстройств у больных с пароксизмальной формой ФП и показано несомненное сходство у ряда больных с пароксизмальной формой ФП субъективной симптоматики приступа ФП с симптоматикой панической атаки [5]. Сам факт развития заболевания и связанные с ним изменения ситуации (утрата трудоспособности, госпитализация и др.) способствуют развитию выраженных психических изменений у пациентов [6].

**Для корреспонденции:** Долгих Владимир Терентьевич, д.м.н., проф., заслуженный деятель науки РФ, зав. каф. патофизиологии с курсом клинической патофизиологии Омского государственного медицинского университета, e-mail: prof\_dolgih@mail.ru

Еще в 50-х годах прошлого века была описана связь между возникновением ФП и тонусом вегетативной нервной системы [7]. В последующих исследованиях было эмпирически доказано нарушение электрофизиологических свойств кардиомиоцитов под влиянием вегетативной нервной системы и возникновение пароксизмов ФП в зависимости от изменений вегетативного тонуса. Вagusные и симпатические влияния модулируют электрофизиологические характеристики предсердных клеток (длительность потенциала действия, рефрактерность и скорость проводимости). Парасимпатические стимулы способствуют возникновению механизма re-entry, а симпатические — триггерной активности [8].

Психоневрологические нарушения ухудшают течение фибрилляции предсердий, усложняя клиническую картину, ведут к повышению частоты обращений за медицинской помощью и увеличивают число ненужных исследований и госпитализаций, оказывают значительное влияние на качество жизни пациентов [9].

Очевидно, что актуальность проблемы психосоматических расстройств, наблюдающихся у больных с ФП, определяется не только их распространенностью и дезадаптирующим влиянием, но и тем, что своевременное лечение этих расстройств во многих случаях становится решающим условием эффективной терапевтической, в том числе и неотложной, помощи. Вышесказанное делает патогенетически обоснованным применение психофармакологических препаратов, нормализующих тонус вегетативной нервной системы, при оказании неотложной медицинской помощи больным с приступами ФП на догоспитальном этапе.

В связи с этим в условиях начавшейся реформы службы скорой медицинской помощи и постоянного дефицита времени на догоспитальном этапе актуальными представляются вопросы неотложной терапии и тактики ведения больных с фибрилляцией предсердий на догоспитальном этапе.

*Цель исследования:* путем проведения сравнительного ретроспективного анализа результатов лечения больных с приступами фибрилляции предсердий изучить эффективность комбинированного применения у них антиаритмических препаратов и диазепама при оказании неотложной медицинской помощи, оценить тактику их ведения и состояние вегетативной нервной системы у данной категории пациентов на догоспитальном этапе.

### Методика

Проводили сравнительное ретроспективное изучение результатов оказания неотложной медицинской помощи 1009 больным с неосложненными приступами фибрилляции предсердий длительностью до 24 ч.

Из них 903 пациентам (I группа) помощь оказывали введением только антиаритмических препаратов, у 106 больных (II группа) использовали комбинированное применение антиаритмиков и диазепама. Продолжительность отдельного эпизода ФП находилась в диапазоне от 30 мин до 28 ч, длительность «аритмического анамнеза» от 2—3 месяцев до 27 лет. Средний возраст пациентов составил  $68,3 \pm 10,93$  года (от 22 до 96 лет). Анализ проводили по картам вызовов бригад скорой помощи, амбулаторным картам поликлиник, историям болезни стационаров.

Использовали доступные для догоспитального этапа методы исследования. Для оценки исходного и конечного (после оказания помощи) вегетативного статуса больных рассчитывали вегетативный индекс Кердо (ВИ), исследовали минутный объем крови (МО) непрямым способом Лилье—Штрандера и Цандера. Для расчета межсистемных кардиореспираторных отношений использовали коэффициент Хильдебранта (Q). Проводили электрокардиографический контроль и регистрацию артериального давления (АД) в течение всего периода наблюдения.

Больные в основном предъявляли жалобы на учащенное сердцебиение, слабость, боли в области сердца и головную боль. У всех обратившихся за скорой медицинской помощью отсутствовали электрокардиографические данные предвозбуждения желудочков и осложнения приступа аритмии, требовавшие немедленной электрической кардиоверсии.

Антиаритмическую терапию в обеих группах проводили препаратами, включенными в «Стандарты медицинской помощи для скорой медицинской помощи». Для купирования приступа ФП внутривенно вводили кордарон (амиодарон, «КРКА») в однократной дозе 5 мг/кг, новокаинамид (прокаинамид, «Органика») в дозе 0,5—1 г, верапамил 5—10 мг (в среднем 0,1 мг/кг) («Алкалоид»), дигоксин 0,25 мг («Никомед»), диазепам 10 мг (Седуксен, «Gedeon Richter»; Релиум, «Ciech»; Сибазон, «Органика»). Антиаритмики применяли на фоне предварительного введения 10 мл панангина («Gedeon Richter»). Действие препаратов оценивали в течение 50—70 мин (в среднем в течение  $64,1 \pm 3,2$  мин). Проводили ЭКГ-контроль и регистрацию артериального давления в течение всего периода наблюдения.

Поскольку распределение вызовов на бригаду скорой медицинской помощи в силу специфики ее работы носит случайный характер, то это дает основание считать выборку случайной, а исследование контролируемым и рандомизированным. Контрольные точки исследования: 1 ч (период пребывания бригады на вызове и наблюдения за больным), 12 ч и 24 ч. Значения представлены в виде средней  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm \sigma$ ). Среднее время купирования

приступа и значения вегетативного индекса Кердо представлены в виде «нижний квартиль-медиана-верхний квартиль» (LQ-Me-UQ). Статистическая обработка результатов проведена с использованием критериев Манна—Уитни для сравнения групп по изучаемым клиническим показателям, Вилкоксона для сравнения изучаемых показателей в каждой из групп до и после лечения,  $\chi^2$  и двустороннего точного критерия Фишера для сравнения групп больных по относительной частоте применяемых антиаритмических препаратов. Использовали методы анализа выживаемости — F-критерий Кокса, метод регрессионной модели пропорциональных интенсивностей Кокса. Анализ связей между выборками выполняли методом ранговой корреляции по Спирмену ( $\rho$ ) с последующим сравнением коэффициентов корреляции, чтобы определить, случайны ли их различия. Величина доверительного интервала, который принят за статистически достоверный в данном исследовании, 95% (уровень значимости  $p$  принят равным 0,05). Статистический анализ осуществляли с помощью программ XLSTAT 2009 v.3.02 (Addinsoft), Statistica v.8.0 (StatSoft, Inc.), табличного процессора Microsoft Office Excel 2010.

## Результаты и обсуждение

Больные обеих групп оказались сопоставимы по возрасту (Тест Манна—Уитни  $p_{1-2} = 0,64$ ), полу и заболеваниям, вызвавшим ФП (Тест Фишера  $p_{1-2} < 0,3$ ), основным клиническим и гемодинамическим показателям, по использованным для оказания медицинской помощи антиаритмическим препаратам (Тест  $\chi^2$   $p_{1-4} = 0,27$ ).

За период пребывания на вызове и наблюдения за больным в обеих группах наблюдалось отчетливое улучшение клинических показателей. Снижение частоты сердечных сокращений и уменьшение частоты дыхания во II группе больных было более выраженным, со статистически значимыми различиями между группами (табл. 1).

В течение первого часа наблюдения за больными ритм был восстановлен в 20,9% случаев среди пациентов 1-й группы и в 40,6% случаев во 2-й группе (Тест Фишера  $p_{1-2} = 0,0011$ ). Высокие исходные значения вегетативного индекса и минутного объема крови в обеих группах указывали на выраженную симпатикотонию (табл. 1). Коэффициент Хильдебранта у больных с ФП был за пределами нормальных значений, что указывает на дискоординацию вегета-

Таблица 1

Влияние антиаритмической терапии на частоту сердечных сокращений, уровень артериального давления, частоту дыхания и вегетативный статус больных ( $M \pm \sigma$ )

Показатель	Этап исследования	1-я группа (n = 903)	2-я группа (n = 106)	Тест Манна-Уитни $p_{1-2}$
ЧСС, мин <sup>-1</sup>	До лечения	135,5 ± 27,13	135,1 ± 22,87	0,8104
	После лечения	94,3 ± 19,91	87,8 ± 14,45	0,0013
Тест Вилкоксона $p_{1-2}$		<0,001	<0,001	—
АД сист., мм рт.ст.	До лечения	147,4 ± 27,84	149,1 ± 25,27	0,5656
	После лечения	133,4 ± 15,47	131,4 ± 16,01	0,1469
Тест Вилкоксона $p_{1-2}$		<0,001	<0,001	—
АД диаст., мм рт.ст.	До лечения	89,6 ± 13,76	90,3 ± 12,81	0,8305
	После лечения	81,7 ± 7,72	80,6 ± 6,96	0,1735
Тест Вилкоксона $p_{1-2}$		<0,001	<0,001	—
ЧД, мин <sup>-1</sup>	До лечения	17,4 ± 2,78	17,2 ± 2,07	0,5656
	После лечения	15,8 ± 1,83	15,2 ± 1,35	0,0007
Тест Вилкоксона $p_{1-2}$		<0,001	<0,001	—
ВИ (LQ-Me-UQ)	До лечения	22,2-33,3-42,7	23,1 — 32,0 — 42,8	0,7829
	После лечения	0,0-11,1-22,2	— 3,6 — 4,7 — 19,5	0,0135
Тест Вилкоксона $p_{1-2}$		<0,001	<0,001	—
Q	До лечения	7,9 ± 1,84	7,9 ± 1,33	0,9472
	После лечения	6,0 ± 1,39	5,8 ± 1,09	0,3185
Тест Вилкоксона $p_{1-2}$		<0,001	<0,001	—
МО (мл)	До лечения	6518,5 ± 1890,24	6587,7 ± 1793,78	0,5250
	После лечения	4495,9 ± 1200,66	4204,5 ± 937,48	0,0090
Тест Вилкоксона $p_{1-2}$		< 0,0001	< 0,0001	—



тивного обеспечения респираторной и кардиальной систем. Улучшение кардиореспираторного соотношения и уменьшение симпатикотонии во II группе, где антиаритмические препараты применялись совместно с диазепамом, к концу 1-го часа наблюдения за больным было более выражено по сравнению с I группой. Значение вегетативного индекса во II группе после оказания неотложной медицинской помощи было в 2,4 раза меньше, чем в первой (табл. 1). Между временем купирования приступа ФП, уменьшением вегетативного индекса и минутного объема крови во II группе наблюдалась статистически значимая

( $p < 0,0001$ ) умеренно выраженная прямая корреляция ( $\rho_{ВИ} = 0,4467$  и  $\rho_{МО} = 0,4222$ ). В I группе корреляционная связь отсутствовала ( $\rho_{ВИ} = 0,0365$  при  $\rho = 0,2617$  и  $\rho_{МО} = 0,0315$  при  $\rho = 0,3333$ ). Коэффициенты корреляции различны с высокой степенью статистической значимости ( $p < 0,0001$ ). К 12-му и 24-му часу наблюдения характеристики сравниваемых выборок по времени купирования приступа ФП совпадают (табл. 2). Такие результаты обусловлены не только проведенной антиаритмической терапией, но и тем, что спонтанная конверсия пароксизма может достигать 66% у пациентов в течение 24 ч после

Таблица 2

Влияние антиаритмической терапии на время купирования приступа фибрилляции предсердий

Группы	Ритм восстановлен			
	До 1 ч	К 12 ч	К 24 ч	Среднее время LQ-Me-UQ
1-я группа (n = 903)	189	736	875	2,0-6,0-10,0
%	20,9%	81,5%	96,9%	—
2-я группа (n = 106)	43	94	102	1,0-2,0-7,0
%	40,6%	88,7%	96,2%	—
Тест Фишера $p_{1-2}$	0,0011	0,5986	0,9999	—
F-критерий Кокса $p_{1-2}$				<0,0001

Таблица 3

Регрессионная модель пропорциональных интенсивностей Кокса в изучаемых группах больных с фибрилляцией предсердий

Группа 1	N = 903		$\chi^2 = 9,6197$ ; число степеней свободы = 8; $p = 0,2928$					
			Бета	Станд. ошибка	t-знач.	Экспон. бета	Стат. Вальда	p
ЧСС, мин <sup>-1</sup>	До лечения		0,0031	0,0013	2,3515	1,0031	5,5299	0,0187
	После лечения		0,0039	0,0019	1,9729	0,9961	3,8927	0,0485
АД <sub>сис.</sub> , мм рт.ст.	До лечения		0,0018	0,0027	0,6861	0,9982	0,4707	0,4926
	После лечения		0,0014	0,0038	0,3676	1,0014	0,1352	0,7131
АД <sub>диаст.</sub> , мм рт.ст.	До лечения		0,0058	0,0049	1,1699	1,0058	1,3688	0,2420
	После лечения		0,0042	0,0068	0,6156	0,9958	0,3791	0,5381
ЧД, мин <sup>-1</sup>	До лечения		0,0032	0,0191	0,1659	1,0032	0,0275	0,8682
	После лечения		0,0106	0,0288	0,3686	1,0107	0,1359	0,7124
Группа 2	N = 106		$\chi^2 = 21,1226$ ; число степеней свободы = 8; $p = 0,0068$					
			Бета	Станд. ошибка	t-знач.	Экспон. бета	Стат. Вальда	p
ЧСС, мин <sup>-1</sup>	До лечения		0,0104	0,0048	2,1735	1,0104	4,7241	0,0297
	После лечения		0,0357	0,0087	4,1101	0,9649	16,8926	0,0000
АД <sub>сис.</sub> , мм рт.ст.	До лечения		0,0034	0,0090	0,3721	0,9966	0,1384	0,7098
	После лечения		0,0079	0,0130	0,6077	1,0079	0,3693	0,5434
АД <sub>диаст.</sub> , мм рт.ст.	До лечения		0,0024	0,0142	0,1724	1,0024	0,0297	0,8631
	После лечения		0,0171	0,0226	0,7603	0,9829	0,5781	0,4471
ЧД, мин <sup>-1</sup>	До лечения		0,0057	0,0741	0,0765	0,9943	0,0059	0,9390
	После лечения		0,0403	0,0981	0,4105	0,9605	0,1685	0,6814

появления аритмии, и только у 17% аритмия может сохраняться более длительный срок [10].

Были проанализированы связи проведенной терапии и полученных результатов путем применения регрессионной модели пропорциональных интенсивностей Кокса. В I группе больных анализ не выявил статистически значимых корреляций между проведенным лечением и клиническими показателями, между временем купирования приступа ФП и примененными антиаритмическими препаратами ( $\rho = 0,2928$  при доле цензурированных наблюдений 8,91%). Во II группе больных, неотложную помощь которым оказывали антиаритмиками в комбинации с диазепамом, анализ показал статистически значимую связь между этими признаками ( $\rho = 0,0068$  при доле цензурированных наблюдений 3,37%). Описание полученных моделей представлено в виде табл. 3, из которой видно, что конечная частота сердечных сокращений во II группе больных тесно ассоциирована со временем до наступления изучаемого исхода.

Для проверки предположения, что проведение антиаритмической терапии и время купирования приступа ФП не находятся в прямой пропорциональной зависимости, был проведен анализ путем применения модели пропорциональных интенсивностей Кокса с зависящими от времени ковариатами. Как показал критерий  $\chi^2$ , между моделями имеется статистически значимое различие ( $\chi^2 = 18,1783$  при  $\rho = 0,0001$ ). Модель, полученная во второй группе, статистически значима ( $\rho = 0,0336$ ) — время купирования приступа ФП в этой группе зависит от применяемой неотложной терапии (антиаритмические препараты в комбинации с диазепамом).

Таким образом, возникновение приступа ФП на догоспитальном этапе сопровождается выраженной симпатикотонией. При оказании неотложной помощи больным с ФП на догоспитальном этапе необходимо учитывать изменения вегетативного тонуса и принимать меры к его коррекции. Комбинация диазепама с антиаритмическими препаратами позволяет добиться более быстрого, зачастую в течение 1-го часа наблюдения за больным, купирования приступа, что позволяет избежать ненужных госпитализаций и улучшить качество жизни больных. Учитывая склонность ФП к спонтанному восстановлению ритма более чем у половины больных [10], а также то, что при фибрилляции предсердий снижение частоты сердечных сокращений и восстановление синусового ритма в одинаковой степени улучшают состояние пациентов, основной задачей проводимой антиаритмической терапии на догоспитальном этапе следует считать не устранение приступа аритмии, а снижение частоты сокращений желудочков сердца.

Принятая в настоящее время тактика обязательной госпитализации [11] больных с неустраненным на догоспитальном этапе неосложненным приступом ФП длительностью до суток представляется нам не совсем правильной. Она ведет к росту числа необоснованных госпитализаций и нерациональному использованию госпитальных ресурсов, к увеличению времени обслуживания вызова бригадой скорой помощи и снижению оборачиваемости бригад, а, следовательно, к увеличению времени ожидания обслуживания, количества опозданий и неоправданным экономическим затратам.

## Выводы

1. Независимо от основного заболевания и применяемых антиаритмических препаратов подавляющее число случаев ФП купируется к концу первых суток от начала лечения.

2. Возникновение приступа ФП на догоспитальном этапе сопровождается выраженной симпатикотонией, что должно учитываться при проведении антиаритмической терапии. Комбинация диазепама с антиаритмическими препаратами позволяет добиться более быстрого купирования пароксизма.

3. Тактика оказания медицинской помощи при неосложненных приступах ФП длительностью до 24 часов на догоспитальном этапе должна быть направлена, в первую очередь, на нормализацию частоты сокращения желудочков сердца и вегетативного дисбаланса.

4. Несостоятельна тактика обязательной госпитализации больных с некупированным в результате лечения на догоспитальном этапе неосложненным приступом ФП длительностью до 24 часов при первичном вызове скорой медицинской помощи.

## Список литературы

1. Ball J., Carrington M.J., McMurray J.J. et al. Atrial fibrillation: Profile and burden of an evolving epidemic in the 21st century. *Int J Cardiol.* 2013; 67 (5): 1807-24.
2. Medi C., Kalman J.M., Spence S.J. et al. Atrial electrical and structural changes associated with longstanding hypertension in humans: implications for the substrate for atrial fibrillation. *Cardiovasc Electrophysiol.* 2011; 22 (12): 1317-24.
3. Сычев Д.А., Рябова А.В., Савельева М.И. Обоснование кратности применения «новых» оральных антикоагулянтов у пациентов с фибрилляцией предсердий: взгляд клинического фармаколога. *Клиническая фармакология и терапия.* 2014; 23 (1): 75-80.
4. Leibowitz D., Stessman-Lande I., Jacobus J. Cardiac structure and function in persons 85 years of age. *Am J Cardiol.* 2011; 108 (3): 465-70.
5. Скурихина О.Н., Миллер О.Н. Уровень тревоги и депрессии у пациентов с пароксизмальной и постоян-

ной формами фибрилляции предсердий. *Вестник аритмологии*. 2009; 55:14-8.

6. Amar D., Zhang H., Miodownik S. Competing autonomic mechanisms precede the onset of postoperative atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 42: 1262-68.

7. Friberg J., Buch P., Scharling H. Rising rates of hospital admissions for atrial fibrillation. *Epidemiology*. 2003; 14: 666-72.

8. Bettoni M., Zimmermann M. Autonomic tone variations before the onset of paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation*. 2002; 105: 2753-9.

9. Amar D., Zhang H., Miodownik S. Competing autonomic mechanisms precede the onset of postoperative atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 42: 1262-8.

10. Погосова Г.В. Признание значимости психоэмоционального стресса в качестве сердечно-сосудистого фактора риска первого порядка. *Кардиология*. 2007; 2: 65-72.

11. Руководство ACC/AHA/HRS по ведению пациентов с фибрилляцией предсердий: обновление 2011 года [Электронный ресурс] *Практическая ангиология: сетевой журн.* — Режим доступа: [<http://angio.health-ua.com/issues/?choice = last 21.12.2011>].

Поступила 11.03.13

## References

1. Ball J., Carrington M.J., McMurray J.J. et al. Atrial fibrillation: Profile and burden of an evolving epidemic in the 21st century. *Int J Cardiol*. 2013; 67 (5): 1807-24.

2. Medi C., Kalman J.M., Spence S.J. et al. Atrial electrical and structural changes associated with longstanding hy-

per-tension in humans: implications for the substrate for atrial fibrillation. *Cardiovasc Electrophysiol*. 2011; 22 (12): 1317-24.

3. Sychev D.A., Ryabova A.V., Savelyeva M.I. Dosing of the «new» oral anticoagulants in patients with atrial fibrillation: view of clinical pharmacologist. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2014; 23 (1): 75-80. (in Russian)

4. Leibowitz D., Stessman-Lande I., Jacobus J. Cardiac structure and function in persons 85 years of age. *Am J Cardiol*. 2011; 108 (3): 465-70.

5. Skurikhina O.N., Miller O.N. Levels of anxiety and depression in patients with paroxysmal and chronic atrial fibrillation. *Vestnik aritmologii*. 2009; 55: 14-8. (in Russian)

6. Amar D., Zhang H., Miodownik S. Competing autonomic mechanisms precede the onset of postoperative atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 42: 1262-8.

7. Friberg J., Buch P., Scharling H. Rising rates of hospital admissions for atrial fibrillation. *Epidemiology* 2003; 14: 666-72.

8. Bettoni M., Zimmermann M. Autonomic tone variations before the onset of paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation*. 2002; 105: 2753-9.

9. Amar D., Zhang H., Miodownik S. Competing autonomic mechanisms precede the onset of postoperative atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2003; 42: 1262-8.

10. Pogosova G.V. Acknowledgement of its value as a first order cardiovascular risk factor. *Kardiologia*. 2007; 47 (2): 65-72. (in Russian)

11. Guide ACC/AHA/HRS for the management of patients with atrial fibrillation: update 2011 [Electronic resource] *Practical angiology: the network journal.* — Access mode: [<http://angio.health-ua.com/issues/? choice=last 21.12.2011>]. (in Russian)

Received 11.03.13

## Сведения об авторах:

Епифанов Вячеслав Георгиевич, к.м.н., ст. врач станции скорой медицинской помощи г.Омска, e-mail: slava\_smp@mail.ru

Буренкова О.В., Александрова Е.А., Зарайская И.Ю.

## **Эффект блокатора гистоновых деацетилаз вальпроата натрия на постнатальное развитие мышечной линии 129SV**

Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Вальпроат натрия в высоких дозировках применяется в качестве противосудорожного препарата, однако его пренатальный и ранний постнатальный прием связан с рядом побочных эффектов, в числе которых повышенный риск возникновения врожденных пороков развития плода и возникновения аутизма у детей. Эти обстоятельства лежат в основе его использования в экспериментальной модели аутизма у грызунов. Одной из мишеней действия вальпроата натрия являются гистоновые деацетилазы, блокатором которых он является, что позволяет использовать его в качестве инструмента для модуляции эпигенетических модификаций генома. Известно, что введение вальпроата натрия в дозировке 50 мг/кг массы неонатальным мышатам вызывает повышение ацетилирования гистона H3 в их мозге. Целью данной работы было изучение влияния введения вальпроата натрия в этой дозировке в первую неделю жизни мышат линии 129Sv на их физическое и соматосенсорное развитие в гнездовом периоде, для чего был использован стандартный прием оценки постнатального развития — батарея развитийных тестов. Результаты введения вальпроата натрия в дозировке 50 мг/кг в первую неделю жизни показали, что данная схема не приводит к нарушению физического, соматосенсорного развития и социального поведения мышат линии 129Sv в гнездовом периоде. Полученные результаты говорят о возможности использования вальпроата натрия в указанной дозировке для дальнейшей экспериментальной модуляции уровня ацетилирования гистонов в развивающемся мозге.

**Ключевые слова:** эпигенетика; ацетилирование гистона H3; блокада гистоновых деацетилаз; вальпроат натрия; модификация поведения; сенсомоторное развитие

Burenkova O.V., Aleksandrova E.A., Zarayskaya I.Yu.

## **Effects of histone deacetylase inhibitor sodium valproate on the physical and behavioral development of 129SV mice**

P.K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology, Russian Federation, 125315, Moscow, Baltiyskaya st., 8

Sodium valproate is a widely used antiepileptic drug at high dosage levels, but it has been shown to produce a variety of toxic side-effects when used during perinatal period. These effects include increased risk of congenital anomalies and autism. For this reason, valproate is commonly employed in animal model of autism. Sodium valproate has multiple molecular targets including histone deacetylases. Therefore valproate can be utilized as a tool for the modulation of epigenetic modifications of the genome via inhibition of histone deacetylases. It is known that administration of sodium valproate at a dose of 50 mg/kg during early postnatal period leads to increase of the histone H3 acetylation level in the brain. The aim of the present study was to evaluate the effects of multiple valproate injections from 3rd to 6th postnatal day (50 mg/kg s.c.) on physical and sensorimotor development of 129Sv mice. The standard battery of tests was used. Our results show that valproate have no negative effect on physical development, sensorimotor function, and social behavior. The obtained results support the applicability of sodium valproate in our dosing schedule for further experimental modulation of histone acetylation level in the developing brain.

**Key words:** epigenetics; acetylation of histone H3; histone deacetylase blockade; sodium valproate; behavior modification; sensorimotor development

Вальпроевая кислота и ее натриевая соль (вальпроат натрия) известны, прежде всего, как противосудорожные препараты, действие которых обусловлено активацией тормозной ГАМКергической системы, подавлением возбуждающей глутаматэргической сис-

темы, а также общим снижением метаболизма в мозге при использовании его в лечебных дозах [1]. Однако пренатальный и ранний постнатальный прием вальпроата является причиной 10-кратного возрастания риска развития аутизма у детей [2]. Использование вальпроата в дозировках, вызывающих нарушения развития нервной системы, лежит в основе экспериментальной модели аутизма у грызунов. Нарушения

**Для корреспонденции:** Буренкова Ольга Владимировна, к.б.н., м.н.с. лаб. системогенеза поведения ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина», e-mail: o.burenkova@nphys.ru



обусловлены тератогенным действием и манифестируются в нарушении социального поведения, двигательного и когнитивного развития, а также внимания. Используемые с этой целью дозировки достаточно высоки. Беременным самкам мышей и крыс вальпроат вводят в дозировках 200—600 мг/кг, а при постнатальном — от 150 мг/кг [3—5].

Еще один механизм действия вальпроата — блокада гистоновых деацетилаз, приводящая к увеличению уровня ацетилирования гистонов — используется как инструмент для модуляции эпигенетических модификаций генома. Ацетилирование гистонов — ключевой фактор, влияющий на структуру хроматина и транскрипцию генов [6]. Высокий уровень ацетилирования гистонов в мозге потомства крыс определяется высоким уровнем материнского поведения самок [7], содержанием животных в обогащенной среде [8]. Напротив, депривация от матери снижает уровень ацетилирования в мозге мышей [9]. Введение блокаторов гистоновых деацетилаз половозрелым крысам приводит к увеличению уровня ацетилирования гистонов в их мозге [10] и улучшает память в моделях слабого обучения [11, 12].

Введение вальпроата натрия в дозировке 50 мг/кг неонатальным мышатам вызывает повышение ацетилирования гистона H3 в мозге [13] и улучшает результаты раннего обонятельного обучения у самцов мышей [14]. Однако вопрос о том, как вальпроат натрия, вводимый мышам в раннем онтогенезе в дозировках, вызывающих повышение ацетилирования

в мозге, влияет на соматосенсорное развитие в гнездовом периоде, остается открытым.

*Цель работы* — изучение влияния введения вальпроата натрия в дозировке 50 мг/кг в первую неделю жизни мышат линии 129Sv на их физическое и соматосенсорное развитие в гнездовом периоде. Для этого мы использовали стандартный прием оценки постнатального развития — батарею развития тестов.

### Методика

Эксперименты проводили в соответствии с требованиями приказа №267 МЗ РФ (19.06.2003 г.), и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина РАМН, протокол №1 от 3.09.2005 г.).

Самок мышей линии 129Sv с видимыми признаками беременности отсаживали от самцов. День обнаружения потомства принимали за 1-е постнатальные сутки (ПС). Перед началом всех манипуляций с потомством самку отсаживали от помета в отдельную клетку-переноску с водой и кормом. На 2ПС потомство взвешивали, определяли пол, наносили и затем поддерживали индивидуальные метки. Животным из группы «физраствор» на 3-и, 4-е, 5-е и 6-е ПС подкожно вводили по 25 мкл физраствора. Животным из группы «вальпроат» — по 25 мкл раствора вальпроата натрия («Sigma», дозировка — 50 мг/кг массы

Таблица

Число использованных животных и сроки проведения тестов

Тест / сроки проведения теста, постнатальные сутки	Группа	Число использованных животных в каждый из дней проведения теста
		Пол: М/Ж
Прозревание / 12 — 20	"Интактные"	14/13, 14/15, 13/15, 12/15, 11/15, 11/15, 10/15, 10/14, 10/12
	"Физраствор"	15/11, 16/14, 15/12, 15/9, 15/9, 15/9, 15/8, 12/8, 11/6
	"Вальпроат"	16/13, 15/12, 14/10, 14/5, 14/6, 14/6, 13/5, 9/5, 9/4
Достижение гнезда / 10 — 15	"Интактные"	4/5, 5/5, 4/5, 4/5, 4/4, 3/4
	"Физраствор"	5/6, 6/5, 5/5, 6/4, 4/4, 5/4
	"Вальпроат"	5/4, 6/5, 6/5, 5/5, 5/3, 5/4
Достижение опоры перекладины / 17 — 20	"Интактные"	13/15, 13/15, 12/14, 12/12
	"Физраствор"	15/12, 15/11, 12/10, 12/8
	"Вальпроат"	14/11, 14/8, 10/6, 11/6
Спуск в чистую клетку / 17 — 20	"Интактные"	13/15, 13/15, 12/14, 12/12
	"Физраствор"	15/12, 14/11, 12/10, 12/8
	"Вальпроат"	14/11, 14/8, 10/6, 11/6
Спуск в домашнюю клетку / 17 — 20	"Интактные"	13/15, 13/15, 11/14, 12/12
	"Физраствор"	15/12, 15/11, 9/10, 12/8
	"Вальпроат"	14/11, 14/8, 9/6, 11/6

тела животного, растворитель — физраствор). Мышатам из группы «интактные» инъекций не делали. Через 30 мин после процедуры мышат и матерей возвращали в домашние клетки. Данные по самцам и самкам анализировали отдельно, так как уровень ацетилирования гистонов в мозге самцов и самок в раннем онтогенезе различается [15, 16].

Для оценки физического развития мышат ежедневно взвешивали, а с 12ПС отслеживали их созревание. С помощью теста достижения гнезда оценивали способность мышат распознавать запах гнезда, который является для них социально-значимым фактором, а поиск гнезда требует развития локомоции [17]. Перед началом тестирования мышат отсаживали в индивидуальные боксы для получасовой депривации. Затем их возвращали в домашнюю клетку, помещая в противоположный от гнезда конец клетки

не более трех мышат, а остальных высаживая непосредственно в гнездо. Регистрировали время достижения детенышами гнезда. Длительность теста — 300 с. Тест достижения опоры горизонтальной перекладины использовали для оценки уровня развития моторной координации [18]. Каждого детеныша помещали передними лапами на середину деревянной цилиндрической перекладины диаметром 0,3 см и длиной 15,5 см, горизонтально закрепленной на двух вертикальных опорах на высоте 15,5 см от поверхности стола. Регистрировали время достижения опоры. Тест спуска в чистую клетку использовали для оценки уровня тревожности. Мышат по одному высаживали на платформу размером 9 x 9 см и высотой 9,5 см, помещенную в чистую пустую клетку для содержания мышей. Регистрировали время спуска с платформы. Длительность теста — 120 с. Тест спу-

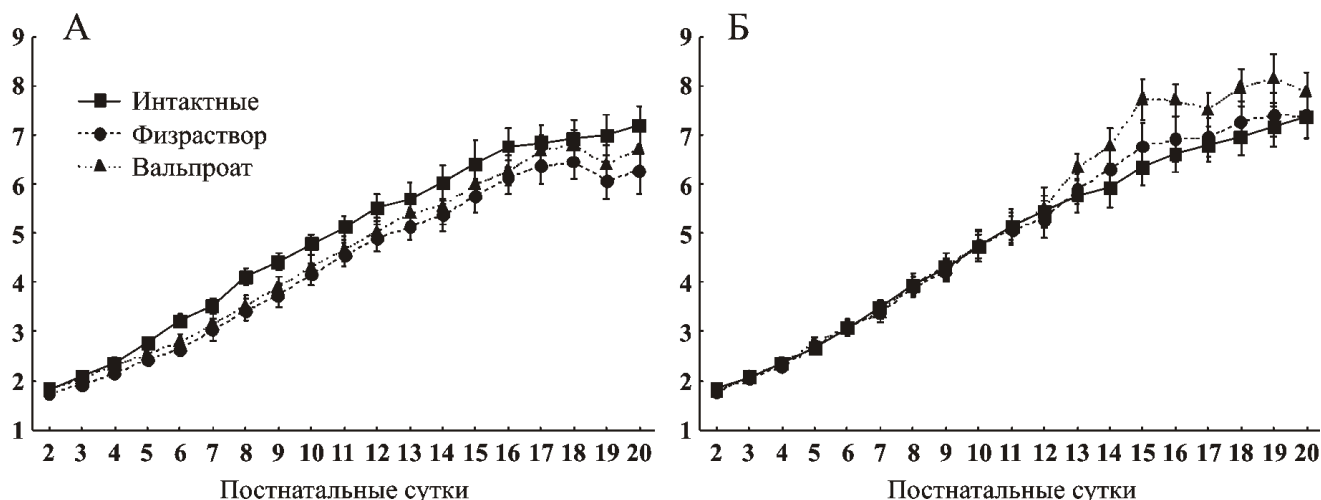


Рис. 1. Масса тела мышат в возрасте 2-20ПС: А — самцов, Б — самок (г) (среднее значение ± стандартная ошибка).

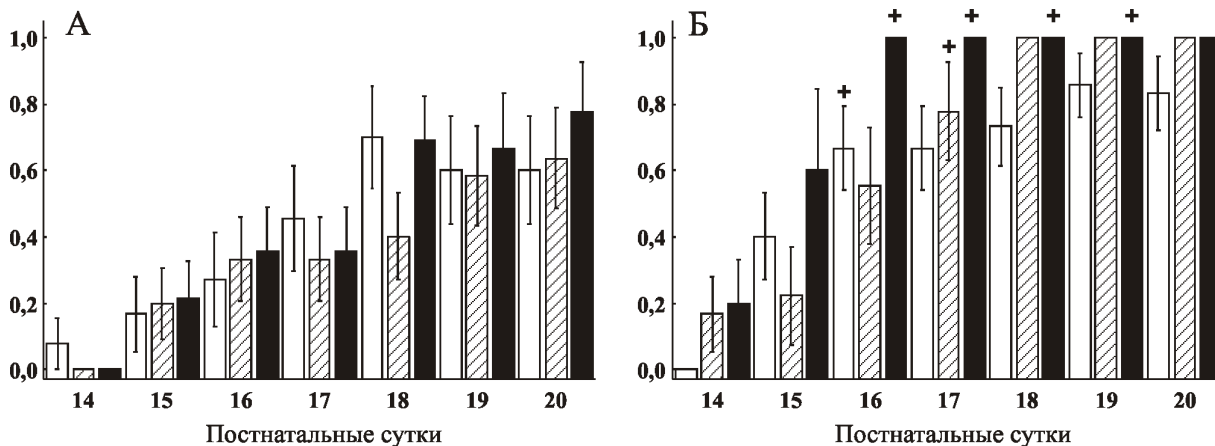


Рис. 2. Степень открывания глаз (балл «1» = оба глаза были полностью открыты, балл «0» = остальные случаи) (среднее значение ± стандартная ошибка), усреднено по обоим глазам (с): А — самцов, Б — самок. Белые столбики — «интактные», заштрихованные — «физраствор», черные — «вальпроат». Крестом обозначены межполовые различия ( $p < 0,05$ ) (непараметрический критерий  $\chi^2$ ).

ска в домашнюю клетку был аналогичен тесту спуска в чистую клетку, за исключением того, что платформа располагалась в домашней клетке каждого помета. Информация о числе использованных животных и сроках проведения тестов представлены в таблице.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Statistica 6.0». Использовали непараметрический U-критерий Манна—Уитни. Результаты прозревания оценивали с помощью непараметрического критерия  $\chi^2$ .

### Результаты и обсуждение

Введение вальпроата натрия не сказалось на массе тела мышат со 2ПС по 20ПС (рис. 1).

Анализ сроков прозревания мышат выявил только межполовые различия во всех исследованных группах (рис. 2). Межгрупповые различия у животных обоих полов отсутствовали.

Таким образом, физическое развитие мышат 129Sv после четырехразового введения вальпроата натрия с 3ПС по 6ПС в дозировке 50 мг/кг массы тела не отличалось от показателей интактных. Известно, что использование более высоких дозировок (от 75 до 150 мг/кг — постнатально, 200—600 мг/кг — пренатально) приводит к замедлению физического развития крысят [19, 20].

Не сказалось введение вальпроата натрия и на результатах теста достижения опоры перекладины, в котором межгрупповые отличия не были выявлены ни в один из проанализированных дней (17-20ПС) (данные не приводятся). Это свидетельствует о том, что его использование в качестве блокатора гистоновых деацетилаз не влияет на формирование координационно-моторных навыков в отличие от эффектов высоких дозировок, при которых нарушения моторных функций обнаружены [4, 5].

В тесте достижения гнезда (рис. 3), проводившемся с 10ПС по 15ПС, на 13ПС самцы из группы «вальпроат» достигали гнездо быстрее, чем из группы «интактные» ( $U = 2,0$ ;  $Z = 2,0$ ;  $p = 0,050$ ). На 15ПС самки из группы «вальпроат» опережали по этому показателю самок из группы «физраствор» ( $U = 0,0$ ;  $Z = 2,3$ ;  $p = 0,021$ ) и «интактные» ( $U = 0,0$ ;  $Z = 2,3$ ;  $p = 0,021$ ). Тест достижения гнезда мышатами, помимо оценки формирования координационно-моторных навыков, использовался нами также для оценки способности к распознаванию запаха. Результаты теста свидетельствуют об отсутствии отрицательного влияния вальпроата в используемой дозировке на социальное поведение, к которому относится поиск гнезда, в отличие от эффектов высоких дозировок в моделях экспериментального аутизма [3, 19].

Результаты согласуются с ранее полученными данными об улучшении процесса раннего обонятельного обучения с материнским подкреплением у самцов на 8ПС после введения аналогичных низких дозировок вальпроата натрия [14].

Оценка способности к спуску в домашнюю клетку с 17ПС по 20ПС не выявила межгрупповых различий у самцов (данные не приводятся). Однако самки из группы «вальпроат» на 20ПС замедляли спуск в домашнюю клетку по сравнению с самками из группы «физраствор» ( $U = 7,5$ ;  $Z = 2,1$ ;  $p = 0,033$ ) (рис. 4). Причиной этому могла бы служить компонента уровня тревожности самок. Однако анализ времени спуска в чистую клетку не выявил межгрупповых различий ни у самцов, ни у самок (данные не приводятся).

Таким образом, результаты введения вальпроата натрия в дозировке 50 мг/кг массы в первую неделю жизни показали, что данная схема не приводит к нарушению физического и соматосенсорного развития мышат линии 129Sv в гнездовом периоде, что позволяет избежать отрицательных последствий для ЦНС,

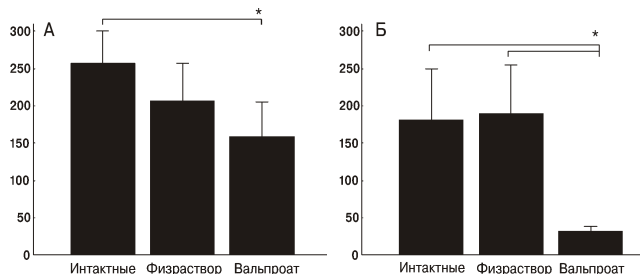


Рис. 3. Время достижения гнезда на 13ПС самцами (А) и 15ПС самками (Б) (среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка) (с); \* —  $p < 0,05$  (U-критерий Манна—Уитни).

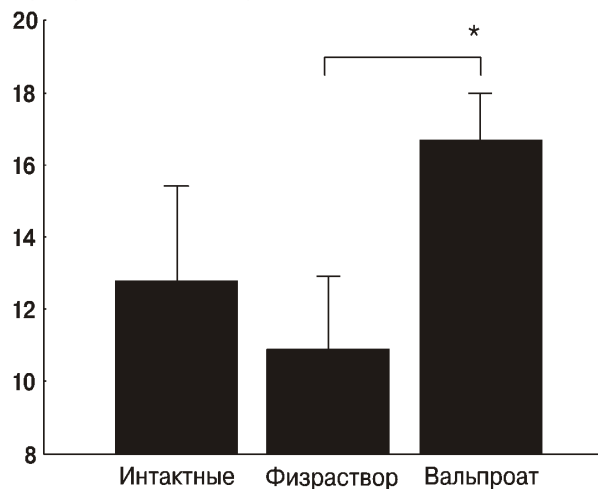


Рис. 4. Время спуска в домашнюю клетку на 20ПС у самок (среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка) (с). \* —  $p < 0,05$  (U-критерий Манна—Уитни).

наблюдаемых при больших дозировках в модели аутизма. Полученные результаты указывают на возможность использования механизма блокады гистоновых деацетилаз с помощью вальпроата натрия в указанной дозировке для дальнейшей экспериментальной модуляции уровня ацетилирования гистонов в развивающемся мозге.

Работа поддержана грантом РФФИ  
№14-04-01768.

### Список литературы

- Johannessen C.U., Johannessen S.I. Valproate: past, present, and future. *CNS Drug Rev.* 2003; 9(2): 199-216.
- Rasalam A., Hailey H., Williams J., Moore S., Turnpenny P., Lloyd D. et al. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Dev. Med. Child Neurol.* 2005; 47(8): 551-5.
- Мальшев А.В., Разумкина Е.В., Дубынин В.А., Мясоедов Н.Ф. Семакс ослабляет проявления мозговой дисфункции, вызванной пренатальным введением вальпроевой кислоты. *Доклады Академии наук.* 2013; 450(3): 361-5.
- Reynolds S., Millette A., Devine D.P. Sensory and motor characterization in the postnatal valproate rat model of autism. *Dev. Neurosci.* 2012; 34(2-3): 258-67.
- Wagner G.C., Reuhl K.R., Cheh M., McRae P., Halladay A. A new neurobehavioral model of autism in mice: pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *J. Autism Dev. Disord.* 2006; 36(6): 779-93.
- Strahl B.D., Allis C.D. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000; 403(6765): 41-5.
- Weaver I.C.G., Cervoni N., Champagne F.A., D'Alessio A., Sharma S., Seckl J. et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience.* 2004; 7(8) 847-54.
- Fischer A., Sananbenesi F., Wang X., Dobbin M., Tsai L.H. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature.* 2007; 447(7141): 178-82.
- Tesone-Coelho C., Morel L.J., Bhatt J., Estevez L., Naudon L., Giros B. et al. Vulnerability to opiate intake in maternally deprived rats: implication of MeCP2 and of histone acetylation. *Addict. Biol.* 2013.
- Roth T.L., Sweatt J.D. Regulation of chromatin structure in memory formation. *Current opinion in neurobiology.* 2009; 19(3): 336-42.
- Day J.J., Sweatt J.D. Cognitive neuroepigenetics: a role for epigenetic mechanisms in learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2011; 96(1): 2-12.
- Levenson J.M., O'Riordan K.J., Brown K.D., Trinh M., Molfese D., Sweatt J.D. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *The Journal of biological chemistry.* 2004; 279(39): 40545-59.
- Murray E.K., Hien A., de Vries G.J., Forger N.G. Epigenetic control of sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Endocrinology.* 2009; 150(9): 4241-7.
- Буренкова О.В., Александрова Е.А., Зарайская И.Ю. Гендер-зависимое действие блокатора гистоновых деацетилаз вальпроата натрия на раннее обоня-

тельное обучение мышей линии 129Sv. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 2013; 99(2): 212-20.

15. Matsuda K.I., Mori H., Kawata M. Epigenetic mechanisms are involved in sexual differentiation of the brain. *Reviews in endocrine & metabolic disorders.* 2012; 13(3): 163-71.

16. Tsai H., Grant P.A., Rissman E.F. Sex differences in histone modifications in the neonatal mouse brain. *Epigenetics.* 2009; 4(1): 47-53.

17. Altman J., Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.* 1975; 23(4): 896-920.

18. Fox W.M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim. Behav.* 1965; 13(2): 234-41.

19. Chomiak T., Karnik V., Block E., Hu B. Altering the trajectory of early postnatal cortical development can lead to structural and behavioural features of autism. *BMC Neurosci.* 2010; 11(102): 1-10.

20. Diaz J., Shields W.D. Effects of dipropylacetate on brain development. *Ann. Neurol.* 1981; 10(5): 465-8.

Поступила 22.12.14

### References

- Johannessen C.U., Johannessen S.I. Valproate: past, present, and future. *CNS Drug Rev.* 2003; 9(2): 199-216.
- Rasalam A., Hailey H., Williams J., Moore S., Turnpenny P., Lloyd D. et al. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Dev. Med. Child Neurol.* 2005; 47(8): 551-5.
- Malyshev A.V., Razumkina E.V., Dubynin V.A., Myasoedov N.F. Semax corrects brain dysfunction caused by prenatal introduction of valproic acid. *Dokl Biol Sci.* 2013; 450(3): 126-9. (in Russian)
- Reynolds S., Millette A., Devine D.P. Sensory and motor characterization in the postnatal valproate rat model of autism. *Dev. Neurosci.* 2012; 34(2-3): 258-67.
- Wagner G.C., Reuhl K.R., Cheh M., McRae P., Halladay A. A new neurobehavioral model of autism in mice: pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *J. Autism Dev. Disord.* 2006; 36(6): 779-93.
- Strahl B.D., Allis C.D. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000; 403(6765): 41-5.
- Weaver I.C.G., Cervoni N., Champagne F.A., D'Alessio A., Sharma S., Seckl J. et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience.* 2004; 7(8) 847-54.
- Fischer A., Sananbenesi F., Wang X., Dobbin M., Tsai L.H. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature.* 2007; 447(7141): 178-82.
- Tesone-Coelho C., Morel L.J., Bhatt J., Estevez L., Naudon L., Giros B. et al. Vulnerability to opiate intake in maternally deprived rats: implication of MeCP2 and of histone acetylation. *Addict. Biol.* 2013.
- Roth T.L., Sweatt J.D. Regulation of chromatin structure in memory formation. *Current opinion in neurobiology.* 2009; 19(3): 336-42.
- Day J.J., Sweatt J.D. Cognitive neuroepigenetics: a role for epigenetic mechanisms in learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2011; 96(1): 2-12.
- Levenson J.M., O'Riordan K.J., Brown K.D., Trinh M., Molfese D., Sweatt J.D. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *The Journal of biological chemistry.* 2004; 279(39): 40545-59.
- Murray E.K., Hien A., de Vries G.J., Forger N.G. Epigenetic control of sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Endocrinology.* 2009; 150(9): 4241-7.
- Буренкова О.В., Александрова Е.А., Зарайская И.Ю. Гендер-зависимое действие блокатора гистоновых деацетилаз вальпроата натрия на раннее обоня-



acetylation during memory formation in the hippocampus. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279(39): 40545-59.

13. Murray E.K., Hien A., de Vries G.J., Forger N.G. Epigenetic control of sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Endocrinology*. 2009; 150(9):4241-7.

14. Burenkova O.V., Aleksandrova E.A., Zарайская I.Iu. Gender-dependent effects of histone deacetylase inhibitor sodium valproate on early olfactory learning in 129Sv mice. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 2013; 99(2): 212-20. (in Russian)

15. Matsuda K.I., Mori H., Kawata M. Epigenetic mechanisms are involved in sexual differentiation of the brain. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2012; 13(3): 163-71.

16. Tsai H., Grant P.A., Rissman E.F. Sex differences in histone modifications in the neonatal mouse brain. *Epigenetics*. 2009; 4(1): 47-53.

17. Altman J., Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.* 1975; 23(4): 896-920.

18. Fox W.M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim. Behav.* 1965; 13(2): 234-41.

19. Chomiak T., Karnik V., Block E., Hu B. Altering the trajectory of early postnatal cortical development can lead to structural and behavioural features of autism. *BMC Neurosci*. 2010; 11(102): 1-10.

20. Diaz J., Shields W.D. Effects of dipropylacetate on brain development. *Ann. Neurol.* 1981; 10(5): 465-8.

Received 22.12.14

#### Сведения об авторах:

Александрова Елена Андреевна, к.м.н., с.н.с. лаб. системогенеза поведения ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина», e-mail: e.alexandrova@nphys.ru

Зарайская Ирина Юрьевна, к.б.н., зав. лаб. системогенеза поведения ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина», e-mail: i.zarayskaya@nphys.ru

Порядин Г.В.<sup>1</sup>, Власов А.П.<sup>2</sup>, Анашкин С.Г.<sup>3</sup>, Власова Т.И.<sup>2</sup>, Потянова И.В.<sup>1</sup>, Турыгина С.А.<sup>1</sup>

## Системные факторы прогрессирования острого панкреатита

- <sup>1</sup> — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
- <sup>2</sup> — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева» Минобрнауки России, 430005, Саранск, ул. Большевикская, 68
- <sup>3</sup> — Медицинский факультет Обнинского института атомной энергетики — филиал ФГАОУ ВПО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» Минобрнауки России, 249040, Обнинск Калужской обл., Студгородок, 1

*В работе на материалах экспериментальных исследований установлена последовательность поражения ряда жизненно важных органов при различных формах острого экспериментального панкреатита (отечный панкреатит, панкреонекроз). Показано, что одним из первых в патологический процесс вовлекается кишечник, затем — печень, далее — почки. Установлено, что в основе поражения органов-мишеней при остром панкреатите выступает мембранодеструктивный процесс за счет избыточной активности процессов перекисного окисления липидов и фосфолипазных систем, что регистрируется не только в плазме крови, но и в тканевых структурах исследованных органов — кишечника, печени, почек (системные дистресс-повреждения оксидативного и фосфолипаз-индуцированного характера).*

**Ключевые слова:** панкреатит, эндотоксикоз, перекисное окисление липидов, кишечник, печень, почки

Poryadin G.V.<sup>1</sup>, Vlasov A.P.<sup>2</sup>, Anasskin S.G.<sup>3</sup>, Vlasova T.I.<sup>2</sup>, Potynova I.V.<sup>1</sup>, Turigina S.A.<sup>1</sup>

## Systemic factors of acute pancreatitis advance

- <sup>1</sup> — GBOU VPO «Russian National Research Medical University of N.I. Pirogov», 117997, Moscow, Ostrovityanov St., 1
- <sup>2</sup> — FGBOU VPO «Mordovian state university of N. P. Ogaryov», 430005, Saransk, Bolshevistskaya St., 68
- <sup>3</sup> — Medical faculty of Obninsk institute of nuclear power — FGAOU VPO branch «National research nuclear university «MIFI», 249040, Obninsk Kaluga Region, Studgorodok, 1

*In experimental studies the sequence of vitals series lesion is established at various forms of acute experimental pancreatitis (edematous pancreatitis, a pancreatonecrosis). It is shown that one of the first in pathological process involves an intestine, then — a liver, further — kidneys. It is established that at acute pancreatitis the basis of a target organs lesion is membranodestruktivny process due to excess activity of lipids peroxidation processes and phospholipase systems which are registered not only in a blood plasma, but also in tissue structures of the studied organs — an intestine, a liver, kidneys (systemic distress damages of oxidative and phospholipase induced character) acts.*

**Key words:** pancreatitis, endotoxicosis, lipid peroxidation, intestines, liver, kidneys

За последние 20 лет отмечен более чем двукратный рост заболеваемости острым панкреатитом. Несмотря на совершенствование методов лечения и техники оперативного вмешательства, летальность при этом заболевании сохраняется на высоком уровне [1, 2].

Известно, что при различных заболеваниях, в том числе и остром панкреатите, патологический процесс сопровождается вовлечением всех систем организма [3]. Системные проявления главным образом обусловлены развитием эндогенной интоксикации (ЭИ),

которая является многогранным патологическим процессом [4, 5].

Несмотря на достаточно полное освещение в литературе вопросов, связанных с этиологией острого панкреатита, одной из недостаточно изученных остается проблема сочетанного поражения различных органов, в том числе связанных с интоксикационным синдромом [4].

Цель исследования — установление последовательности вовлечения в патологический процесс жизненно важных органов при различных формах острого экспериментального панкреатита и определение роли перекисного окисления липидов (ПОЛ) и фосфолипазной активности в этом процессе.

**Для корреспонденции:** Власов Алексей Петрович, зав. каф. факультетской хирургии, д.м.н., проф., ФГБОУ ВПО «Мордовский госуниверситет им. Н.П. Огарева»), e-mail: var.61@yandex.ru

## Методика

Хронические опыты выполнены на взрослых беспородных половозрелых собаках обоего пола массой от 5,8 до 14,3 кг, разделенных на 2 группы. В 1-й группе ( $n = 16$ ) моделировали отечную форму, во 2-й ( $n = 20$ ) — некротическую форму панкреатита. Острый панкреатит моделировали по способу В.М. Буянова с соавторами (1989) путем введения желчи в паренхиму поджелудочной железы. В контрольные сроки исследования (12 ч, 1-е, 3-и и 5-е сутки) производили релaparотомию, оценивали состояние органов брюшной полости, определяли характер их поражений, производили биопсию тканей печени, кишечника и почек, осуществляли забор крови и мочи. В послеоперационном периоде животным проводили инфузионную терапию (внутривенные введения 5% раствора глюкозы и 0,89% раствора хлорида натрия из расчета 50 мл/кг массы животного). Исследования выполнены в соответствии с этическими требованиями к работе с экспериментальными животными (Федеральный закон «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (приказ МЗ РФ от 19.06.2003 г. №267) и одобрены локальным этическим комитетом.

Выраженность ЭИ оценивали по следующим показателям: содержание молекул средней массы (МСМ) определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре СФ-46 при длинах волн 254 и 280 нм (Пикуза О.И., Шакирова Л.З., 1994); общую и эффективную концентрацию альбумина (ОКА и ЭКА) в сыворотке крови — флуоресцентным методом на специализированном анализаторе АКЛ-01 «Зонд»; резерв связывания альбумина (РСА) определяли по формуле  $РСА = ЭКА/ОКА$ ; индекс токсичности (ИТ) плазмы — по формуле  $ИТ = ОКА/ЭКА - 1$  (Грызунов Ю.А., Добрецов Г.Е., 1994). Активность альфа-амилазы исследовали, используя метод ферментативного гидролиза крахмала (Досон Р. и др., 1991). Показатели интенсивности ПОЛ: диеновые конъюгаты (ДК) определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 232—233 нм (Ганстон Ф.Д., 1986); уровень малонового диальдегида (МДА) — спектрофотометрическим методом в реакции с тиобарбитуровой кислотой (Sigma) (Егоров Д.Ю., Козлов А.В., 1988); активность супероксиддисмутазы (СОД) оценивали в реакции с нитросиним тетразолием (Гуревич В.С. и др., 1990). Активность фосфолипазы  $A_2$  (ФЛ  $A_2$ ) исследовали в среде, содержащей 10 ммоль трис-НСL-буфер (рН 8,0), 150 ммоль тритон Х-100, 10 ммоль  $CaCl_2$  и 1,2 ммоль субстрата, в качестве которого использовали фосфатидилхолины яичного желтка (Трофимов В.А., 1999). Вено-ве-

нозный градиент определяли по методу Лендиса: изменение гистогематической проницаемости регистрировалось по капиллярной фильтрации и потере белка (Чернух А.М. и др., 1984). Окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) (редокс-потенциал) для изучения электрогенеза тканей кишечника регистрировали на универсальном ионметре ЭВ-74 (Труфанов Л.А., 1991). Коэффициент диффузии кислорода (КДК) в тканях устанавливали на основе учета темпа падения диффузного тока восстановления по уравнению И. М. Эпштейна (Труфанов Л.А., 1991). В сыворотке крови определяли уровень мочевины, билирубина, креатинина, активность аланиновой и аспарагиновой аминотрансфераз (АЛТ и АСТ) (Досон Р. и др., 1991). Клубочковую фильтрацию рассчитывали унифицированным методом по клиренсу эндогенного креатинина (Шюк О., 1981; Панченко Н.И., 1988). Канальцевую реабсорбцию воды определяли по формуле: клубочковая фильтрация — диурез и выражали в процентах. Минутный диурез определяли посредством забора мочи из мочевого пузыря путем катетеризации.

Полученные цифровые данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента, корреляционный анализ — критерия г.

## Результаты и обсуждение

Опыты показали, что избранная модель патологии была вполне адекватной: у животных 1-й группы развивался острый панкреатит отечной формы с наибольшими морфологическими изменениями в первые трое суток после операции и уменьшением явлений воспаления в последующие сроки; во 2-й группе — острый деструктивный панкреатит с преимущественным очаговым поражением органа (очаговый панкреонекроз), при котором в течение всего периода наблюдения в поджелудочной железе отмечались выраженные морфологические явления — очаги некроза тканей, особенно в местах введения желчи.

Изучение функционального статуса кишечника при остром панкреатите отечной формы показало, что уже в самые ранние сроки в стенке тонкой кишки возникали нарушения микроциркуляции. Это сопровождалось ухудшением трофики и электрогенеза тканей органа. Были зафиксированы достоверное падение ОВП, снижение КДК на фоне повышения проницаемости микроциркуляторного русла для капиллярного фильтрата и белка. Изменения в стенке тонкой кишки имели обратимый характер, о чем свидетельствовала их регрессия к 5-м сут наблюдения.

При панкреонекрозе в тканях кишечника выявлены более значимые нарушения сосудистой проницаемости

и электрогенеза. Так, образование капиллярного фильтра было выше нормы на 64,22—194,83% ( $p < 0,05$ ), потеря белка — на 67,70—291,30% ( $p < 0,05$ ). По сравнению с 1-й группой продукция капиллярного фильтра была выше на 57,76—107,33% ( $p < 0,05$ ). Окислительно-восстановительный потенциал ткани кишечника снижался на 32,86—88,1% ( $p < 0,05$ ), а относительно 1-й группы — на 23,02—64,11% ( $p < 0,05$ ). На этапах динамического наблюдения КДК был ниже нормы на 18,30—48,47% ( $p < 0,05$ ), а по сравнению с 1-й контрольной группой — на 12,54—26,77% ( $p < 0,05$ ).

Подчеркнем, что нарушение трофики и микроциркуляции тканевых структур кишечника при остром деструктивном панкреатите регистрировались уже через 12 ч после моделирования. Отметим, что при панкреонекрозе уровень токсических продуктов в крови, оттекающей от кишечника, был существенно выше, чем в общем кровотоке.

Экспериментально установлено, что при остром панкреатите происходило изменение функционального состояния печени. При деструктивном панкреатите изменения показателей функционального статуса печени были более значимыми: активность АСТ и АЛТ в плазме крови возрастала на 57,14—88,57 и 63,41—120,73% ( $p < 0,05$ ) соответственно. По сравнению с контролем она была выше на 15,24—43,90 и 12,82—36,14% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Наблюдалось увеличение содержания общего билирубина и креатинина по сравнению с нормой на 41,68—101,61 и 28,05—96,77% ( $p < 0,05$ ) соответственно, что также было значительно выше, чем при отечной форме панкреатита.

При остром панкреатите выявлены существенные изменения функционального статуса почек. Причем при деструктивном панкреатите нарушение функции почек было более выраженным. Уже с первых суток заболевания выявлялись достоверные отклонения от

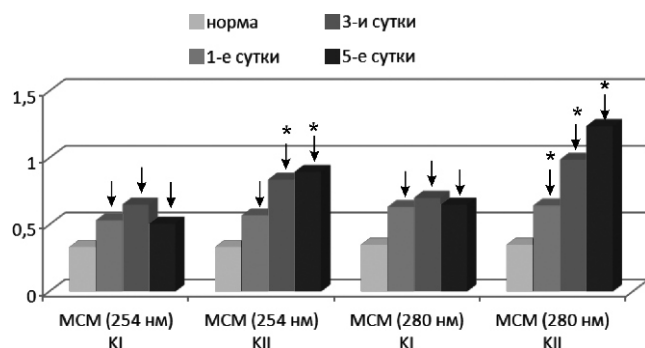
нормальных значений показателей азотистого обмена и функциональных почечных проб. При сравнении показателей с группой контроля содержание креатинина плазмы крови были выше на 11,48—18,03% ( $p < 0,05$ ), мочевины — на 18,06—30,53% ( $p < 0,05$ ). Клубочковая фильтрация при панкреонекрозе снижалась по сравнению с нормой на 23,73—46,37% ( $p < 0,05$ ), а по сравнению с контролем — на 18,83 и 33,94% ( $p < 0,05$ ). Уровень канальцевой реабсорбции у животных с деструктивной формой острого панкреатита был достоверно ниже нормы на 23,27—48,72% ( $p < 0,05$ ), а относительно контроля — на 13,55—28,24% ( $p < 0,05$ ).

Отметим, что через 12 ч после моделирования как отечной, так и деструктивной формы острого панкреатита существенных отклонений показателей функционального статуса печени и почек не возникало.

Лабораторными исследованиями выявлено, что при моделированном панкреатите уровень токсических продуктов в плазме крови возрастал. В патогенезе эндотоксикоза, как показали исследования, важнейшую роль играет не только орган поражения — поджелудочная железа, но и орган-мишень — кишечник. Безусловно, в прогрессировании эндогенной интоксикации на определенном этапе развития патологического процесса играет и нарушение функциональной активности органов детоксикационной системы — печени и почек.

Исследованиями установлено, что при деструктивной форме острого панкреатита проявления эндотоксикоза по сравнению с отечной формой заболевания имели более выраженный характер. Содержание МСМ ( $\lambda = 254$  нм) при остром деструктивном панкреатите было выше, чем при отечной форме на 57,70—120,54% ( $p < 0,05$ ), концентрация МСМ ( $\lambda = 280$  нм) — на 82,80—169,05% ( $p < 0,05$ ), РСА — ниже на 6,67—29,33% ( $p < 0,05$ ) (рисунок). Прогрессирующее накопление токсинов в крови проявлялось в виде существенного повышения ИТ плазмы крови на всех этапах наблюдения. При деструктивной форме острого панкреатита он был выше на 44,12—285,29% ( $p < 0,05$ ).

Повышение титра токсических продуктов в плазме крови сопровождалось интенсификацией процесса ПОЛ и активизацией фосфолипаз, причем при деструктивном панкреатите указанные процессы были выражены в значительно большей степени. Так, уровень ДК плазмы крови при деструктивном панкреатите превосходил таковой при отечной форме панкреатита на 33,32—57,77% ( $p < 0,05$ ), содержание МДА — на 17,14—67,62% ( $p < 0,05$ ). По сравнению с контролем наблюдалось еще большее (на 12,26—44,21%) снижение активности СОД.



Содержание среднемолекулярных пептидов (МСМ) в плазме крови: KI — отечная форма; KII — деструктивная форма острого панкреатита; значения нормы приняты за 100%; \* — достоверность отличия от нормы при  $p < 0,05$ ; — достоверность отличия от данных первой группы при  $p < 0,05$



Существенная роль в патогенезе острого панкреатита принадлежит фосфолипазе А<sub>2</sub>. При отечной форме ее активность возрастала в 5,3—8,5 раза ( $p < 0,05$ ), а при деструктивной форме — в 8,6—12,1 раза ( $p < 0,05$ ).

Интересно, что интенсификация ПОЛ и повышение фосфолипазной активности отмечается не только в плазме крови, но и в тканевых структурах как органа-поражения, так и органов-мишеней.

При отечной форме острого панкреатита содержание ДК и МДА в тканях кишечника на всех этапах наблюдения было статистически значимо выше нормы. Так, уже через 12 ч концентрация диеновых конъюгатов была выше нормы на 86,95% ( $p < 0,05$ ), а в последующие сроки — на 169,57—313,04% ( $p < 0,05$ ). При деструктивной форме острого панкреатита уровень ДК и МДА возрастал еще в большей степени. Это сопровождалось существенным падением активности СОД на 13,6—23,4% ( $p < 0,05$ ). Активность фосфолипазы А<sub>2</sub> в ткани кишечника при остром отечном панкреатите возрастала: через 12 ч — в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ), а в последующие сроки — в 2,3—2,85 раза ( $p < 0,05$ ). При деструктивном панкреатите активность фосфолипазы А<sub>2</sub> была выше, чем при отечной форме острого панкреатита, на 21,95—89,08% ( $p < 0,05$ ).

Повышенная активность ПОЛ и фосфолипаз выявлено и в тканевых структурах печени и почек. От-

метим, что темп их активизации, по сравнению с кишечником, был меньшим.

Таким образом, при остром отечном панкреатите поражение органов-мишеней — кишечника, печени и почек обратимо и не носит угрожающий характера; при остром деструктивном панкреатите возникает существенное их поражение с нарушением функции, которое обуславливает прогрессирующие расстройства гомеостаза, особенно рост эндогенной интоксикации. При панкреонекрозе поражение кишечника возникает одним из первых и проявляется развитием энтеральной недостаточности, что обуславливает существенное повышение уровня токсических продуктов в плазме крови, оттекающей от кишечника.

Для доказательства взаимосвязи между функционально-метаболическими нарушениями со стороны исследуемых органов и выраженностью ЭИ был проведен корреляционный анализ. Выявлена статистически значимая корреляционная взаимосвязь между нарушениями функционального статуса кишечника, печени, почек и выраженностью ЭИ. Статистический анализ показал, что нарушение функционального статуса исследованных органов сопряжено не только с эндогенной интоксикацией, но и с интенсивностью процесса ПОЛ и активностью фосфолипазных систем в их тканевых структурах (!). Отмечено, что корреляционная связь была большей при деструктивной форме острого панкреатита (см. таблицу).

Таблица

Корреляционная зависимость между показателями функционального статуса органов-мишеней, эндогенной интоксикации, интенсивности ПОЛ и фосфолипазы А<sub>2</sub> при остром панкреатите деструктивной формы

Показатель	МСМ (λ254)	МСМ (λ280)	ИТ	РСА	ДК	МДА	ФЛ А <sub>2</sub>	СОД
Функциональные показатели кишечника								
Капиллярный фильтрат	<b>0,940</b>	<b>0,834</b>	<b>0,958</b>	<b>0,859</b>	<b>0,789</b>	<b>0,781</b>	<b>0,964</b>	<b>0,895</b>
Потеря белка	<b>0,846</b>	<b>0,909</b>	<b>0,866</b>	<b>0,787</b>	<b>0,919</b>	<b>0,833</b>	<b>0,767</b>	<b>0,848</b>
ОВП	<b>0,826</b>	<b>0,969</b>	<b>0,942</b>	<b>0,982</b>	<b>0,891</b>	<b>0,921</b>	<b>0,936</b>	<b>0,859</b>
Коэффициент диффузии O <sub>2</sub>	<b>0,931</b>	<b>0,954</b>	<b>0,869</b>	<b>0,954</b>	0,623	<b>0,954</b>	<b>0,990</b>	<b>0,890</b>
Функциональные показатели печени								
АСТ	<b>0,965</b>	<b>0,992</b>	<b>0,895</b>	<b>0,938</b>	<b>0,915</b>	<b>0,819</b>	<b>0,866</b>	<b>0,878</b>
АЛТ	<b>0,972</b>	<b>0,957</b>	<b>0,893</b>	<b>0,955</b>	<b>0,899</b>	<b>0,991</b>	<b>0,964</b>	<b>0,984</b>
Креатинин	<b>0,973</b>	<b>0,961</b>	<b>0,898</b>	<b>0,789</b>	<b>0,987</b>	<b>0,967</b>	<b>0,952</b>	<b>0,934</b>
Общий билирубин	<b>0,987</b>	<b>0,961</b>	<b>0,959</b>	<b>0,966</b>	<b>0,948</b>	<b>0,966</b>	<b>0,931</b>	<b>0,942</b>
Функциональные показатели почек								
Мочевина	<b>0,932</b>	<b>0,948</b>	<b>0,946</b>	<b>0,896</b>	<b>0,999</b>	0,588	<b>0,893</b>	<b>0,983</b>
Остаточный азот	<b>0,977</b>	<b>0,928</b>	<b>0,994</b>	<b>0,831</b>	0,623	<b>0,998</b>	<b>0,969</b>	<b>0,968</b>
Клубочковая фильтрация	<b>0,895</b>	<b>0,958</b>	<b>0,936</b>	<b>0,932</b>	<b>0,921</b>	<b>0,859</b>	0,523	<b>0,936</b>
Канальцевая реабсорбция	<b>0,954</b>	<b>0,973</b>	<b>0,896</b>	<b>0,954</b>	<b>0,961</b>	<b>0,972</b>	<b>0,983</b>	<b>0,934</b>

Примечание. Достоверная корреляционная зависимость выделена жирным шрифтом.

Фактический материал позволяет сделать следующее заключение.

Во-первых, при остром панкреатите интенсификация ПОЛ и активизация фосфолипазных систем отмечается не только в плазме крови, но и в тканевых структурах исследованных органов-мишеней.

Во-вторых, выраженность функциональных расстройств органов-мишеней находится в прямой корреляционной зависимости с интенсивностью процесса ПОЛ и фосфолипазной активностью не только и не столько плазмы крови, сколько в их тканевых структурах.

В-третьих, выявлена закономерность последовательности проявлений указанных патофизиологических явлений на органном уровне: одним из первых в патологический процесс вовлекается кишечник, затем — печень, далее — почки.

Таким образом, при остром панкреатите в развитии альтерации и сосудистых изменений в органах-мишенях — основы острого нарушения их функционального состояния — важную роль играет не только эндогенная интоксикация, но и мембранодеструктивный процесс за счет избыточной активности процессов ПОЛ и фосфолипазных систем в тканевых структурах исследованных органов (системные дистресс-повреждения оксидативного и фосфолипаз-индуцированного характера).

### Список литературы

1. Савельев В.С., Филимонов М.И., Бурневич С.З. Панкреонекрозы. М.: МИА; 2008.
2. Lankisch P.G., Warnecke B., Bruns D. et al. The APACHE II score is unreliable to diagnose necrotizing pancreatitis on admission to hospital. *Pancreas*. 2002; 24: 217-22.
3. Благовестнов Д.А., Хватов В.Б., Упырев А.В. и др. Комплексное лечение острого панкреатита и его осложнения. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2004; 5: 68-75.
4. Власов А.П., Трофимов В.А., Крылов В.Г. Системный липидный дистресс-синдром в хирургии. М.: Наука; 2009.
5. Келина Н.Ю., Васильков В.Г., Безручко Н.В. Оценка развития синдрома эндогенной интоксикации при токсической стадии разлитого перитонита: *Вестник интенсивной терапии*; 2001; 3: 51-5.

Поступила 31.03.15

### References

1. Savelyev V.S., Filimonov M.I., Burnevich S.Z. *Pancreatic necrosis*. M.: MIA; 2008. (in Russian)
2. Lankisch P.G., Warnecke B., Bruns D. et al. The APACHE II score is unreliable to diagnose necrotizing pancreatitis on admission to hospital. *Pancreas*. 2002; 24: 217-22.
3. Blagovestnov D.A., Hvatov V.B., Upyrev A.V. et al. Complex treatment of acute pancreatitis and its complications. *Surgey. Journal of them. NI Pirogov*. 2004; 5: 68-75. (in Russian)
4. Vlasov A.P., Trofimov V.A., Krylov V.G. *Systemic lipid distress syndrome in surgery*. M.: Science; 2009. (in Russian).
5. Kalin N.Y., Vasil'kov V.G., Bezruchko N.V. Assessment of endogenous intoxication in toxic stage of peritonitis; *Bulletin of intensive care*; 2001; 3: 51-5. (in Russian)

Received 31.03.15

### Сведения об авторах:

Порядин Геннадий Васильевич, д.м.н., член-корр. РАН, проф., зав. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии; e-mail: gen@rsmu.ru

Власов Алексей Петрович, д.м.н., проф., зав. каф. факультетской хирургии; e-mail: var.61@yandex.ru

Анашкин Сергей Геннадьевич, к.м.н., зав. каф. хирургии; e-mail: asg72@list.ru

Потянова Ирина Владимировна, к.м.н., ассистент каф. госпитальной терапии

Турьгина Светлана Анатольевна, к.биол.н., доцент каф. гистологии

Будылина С.М.<sup>1</sup>, Дмитриева Л.А.<sup>1</sup>, Костина Н.В.<sup>1</sup>, Георгиева О.А.<sup>1</sup>, Перцов С.С.<sup>1,2</sup>

## **Вкусовое восприятие при клиническом симптомокомплексе гастроэзофагеальной рефлюксной болезни**

<sup>1</sup> — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздрава России, 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

<sup>2</sup> — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Важным критерием состояния слизистой оболочки полости рта пациентов с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью является вкусовое восприятие. Язык как орган вкуса характеризуется существенными изменениями функционального состояния при поражении кислотосодержащими субстратами в результате рефлюкса. Изучены особенности вкусовой чувствительности и возможность её коррекции у 75 пациентов с данной патологией. Посредством усовершенствованной методики густометрии и метода функциональной мобильности установлен характер изменения активности вкусовых рецепторов языка и порогов вкусовой чувствительности пациентов до и после проведенной терапии. Выявлены специфические изменения сенсорной функции полости рта, обусловленные кислотной агрессией. Полученные результаты свидетельствуют о возможности коррекции вкуса у пациентов с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью. Учитывая особенности общего заболевания, включение в комплексное лечение зубной пасты Parodontax-F и Эмалана сопровождается улучшением вкусового восприятия. Коррекция дисгевзии представляет собой важный показатель положительной динамики качества жизни пациентов.

**Ключевые слова:** гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь; Эмалан; Parodontax-F; густометрия; вкусовое восприятие

Budylyna S.M.<sup>1</sup>, Dmitrieva L.A.<sup>1</sup>, Kostina N.V.<sup>1</sup>, Georgieva O.A.<sup>1</sup>, Pertsov S.S.<sup>1,2</sup>

## **Taste perception during clinical symptom complex of gastroesophageal reflux disease**

<sup>1</sup> — A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Delegatskaya St. 20-1, Moscow, 127473 Russia

<sup>2</sup> — Federal State Scientific Institution «P.K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology», Baltiiskaya St. 8, Moscow, 125315 Russia

Taste perception is an important criterion for the state of the oral mucous membrane in patients with gastroesophageal reflux disease. The tongue, as an organ of taste, is characterized by serious changes in the functional state after injury with acid-containing substrates due to reflux. The specific features of taste perception and possibility for their correction were studied in 75 patients with this disorder. The type of changes in activity of tongue taste receptors and taste thresholds in patients before and after therapy were estimated by means of advanced gustometry and functional mobility technique. Specific changes in sensory function of the oral cavity were shown to be associated with acid aggression. Our results illustrate the possibility of taste correction in patients with gastroesophageal reflux disease. Taking into account some features of the general disease, it can be concluded that the introduction of Parodontax-F toothpaste and Emalan into combined therapy is accompanied by the improvement of taste perception. Correction of dysgeusia is an important criterion for the improvement of the quality of life of patients.

**Key words:** gastroesophageal reflux disease; Emalan; Parodontax-F; gustometry; taste perception

Согласно данным Всемирного гастроэнтерологического конгресса в Шанхае (2013 г.), гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ) за последние десятилетия стала одним из самых распро-

странённых гастроэнтерологических заболеваний, значительно влияющим на качество жизни пациентов [1].

С патофизиологической точки зрения ГЭРБ — многофакторное кислотозависимое заболевание, развивающееся на фоне первичных нарушений в верхних отделах пищеварительного тракта. Её возникновению способствует, в первую очередь, снижение тонуса

**Для корреспонденции:** Костина Наталья Владимировна, врач-стоматолог, соискатель каф. пародонтологии ГБОУ ВПО МГМСУ им. А.Е. Евдокимова, 127006, Москва, ул. Долгоруковская, д. 4, стр. 2, e-mail: manata65@yandex.ru

нижнего пищевого сфинктера, которое выявляется почти у 80% пациентов и провоцирует возникновение эпизодов гастроэзофагеального рефлюкса [2—4].

Актуальность проблемы ГЭРБ обусловлена её серьёзными осложнениями. Именно поэтому изучение патогенеза ГЭРБ и возможность коррекции указанного заболевания привлекают к себе внимание ученых и практикующих врачей разных специальностей [5].

Наряду с основным симптомокомплексом ГЭРБ (изжога, регургитация, дисфагия, одинофагия, боли в эпигастральной области), важным аспектом этой патологии являются стоматологические проявления, а именно: обильный налёт и наличие десквамаций, жжение языка, образование эрозий слизистой оболочки полости рта и эмали зубов, поражение тканей пародонта, изменения восприятия вкуса и запаха.

Одним из ведущих критериев оценки состояния слизистой оболочки полости рта и языка у пациентов с ГЭРБ является уровень вкусового восприятия, который претерпевает различные изменения в зависимости от тяжести течения заболевания.

*Цель исследования* — изучение особенностей вкусового восприятия у пациентов с ГЭРБ и оценка возможности коррекции нарушений вкуса при данной патологии.

### Методика

Обследовано 75 пациентов в возрасте от 20 до 65 лет (средний возраст 42,5 года), из них 36 мужчин и 39 женщин с установленным диагнозом ГЭРБ. Лечение основной патологии проводили согласно современным стандартам терапии [6].

Обязательным условием проведения клинических испытаний было подписание пациентом добровольного информированного согласия, содержащего сведения о цели, задачах, методах и сроках исследования.

Все пациенты были разделены на 3 группы. В первую группу вошли 25 пациентов, использующих традиционную гигиену полости рта. Вторую группу составили 25 пациентов, применяющих зубную пасту Parodontax-F. Третья группа состояла из 25 пациентов, пользующихся зубной пастой Parodontax-F и Эмаланом.

Выбор препаратов для индивидуальной гигиены полости рта у пациентов с ГЭРБ был обусловлен необходимостью нормализации показателя рН полости рта, который при рефлюксе сдвинут в кислую среду [7]. Поэтому в нашем исследовании применялась зубная паста Parodontax-F.

Зубная паста Parodontax-F (туба 75 мл; GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, UK) содержит 70%

активных ингредиентов, уникальную комбинацию растительных экстрактов и высокую концентрацию бикарбоната натрия (абразив). Благодаря этим свойствам зубной пасты создается щелочная среда ( $\text{pH} > 8$ ), что приводит к уменьшению вязкости и облегчению удаления полисахаридного матрикса зубного налета.

Эмалан (представлен лабораторией Иннофарм, Россия) — мощный эпителизатор, главным компонентом, которого является трехспиральный коллаген — основа гидрогеля, который способствует заживлению повреждений, препятствует развитию анаэробных микроорганизмов, нормализует природный водный баланс.

После четырехнедельного курса комплексного лечения пациентов с применением зубной пасты Parodontax-F и Эмалана проведена оценка эффективности проведённой терапии, критерием которой явилась динамика клинических симптомов, индексов гигиены, параметров густометрии, показателя уровня мобилизации вкусовых сосочков языка и амплитуды гастролингвального рефлекса (ГЛР).

При оценке гигиенического состояния и характера течения патологических процессов в полости рта учитывали количество баллов индекса гигиены (ИГ; Greene J., Vermillion J., 1969), где: 0—0,6 баллов — хороший, 0,7—1,6 баллов — средний, 1,7—2,5 баллов — плохой, 2,6 баллов и выше — очень плохой уровень гигиены. В соответствии с параметром индекса кровоточивости РВІ (Papillary Bleeding Index; модифицированный индекс кровоточивости десневой борозды), показатель кровоточивости менее 10% считали допустимым и соответствующим 0 баллов. Пародонтальный индекс (ПИ; Russel A.L., 1956), выражаемый в баллах, соответствовал следующим состояниям: 0—0,2 баллов — норма, 0,2—3,0 баллов — гингивит, 3,0—8,0 баллов — пародонтит.

Для количественной оценки выраженности налета на языке использовали индекс язычного налета WTC (Winkel Tongue Coating; Yaegaki K., 1998), где: 0 — отсутствие налета или небольшой налет, 2 — обильный налет.

*Метод пороговой густометрии* позволяет оценить порог вкусовых ощущений человека на различные вкусовые вещества путем нанесения капельных раздражений на слизистую оболочку языка. Использование в нашей работе данного метода позволило провести сравнительный анализ вкусового восприятия у практически здоровых людей (норма) и пациентов с ГЭРБ [8].

*Метод функциональной мобильности*, применяемый в выполненном исследовании, позволил определить количество активных вкусовых сосочков языка обследуемых в разных функциональных состояниях



(голод и насыщение) [9]. В норме до приема пищи количество функционирующих сосочков языка больше, чем после еды. Пища, попадая в желудок и раздражая соответствующие рецепторы, уменьшает количество функционирующих вкусовых рецепторов языка по механизму ГЛР [10].

*Статистический анализ.* Данные в таблицах представлены в виде  $M \pm m$ . В связи с тем, что выборки количественных данных не удовлетворяли критериям нормального распределения ( $p < 0,05$  по критерию Шапиро—Уилка), для проведения сравнительного статистического анализа использованы непараметрические критерии. Сравнение двух независимых количественных показателей проводили с помощью критерия Манна—Уитни. Сравнение качественных признаков выполнено посредством критерия  $\chi^2$  или точного критерия Фишера. Сравнение нескольких независимых количественных выборок проводили с использованием критерия Крускала—Уоллиса. Сравнение зависимых количественных признаков (оценка динамики параметров) выполнено с помощью критерия Вилкоксона. Различия между группами считались статистически значимыми при значении  $p < 0,05$ . Анализ проведен с использованием статистического пакета Statistica StatSoft 8.0.

## Результаты и обсуждение

В структуре жалоб пациентов всех групп преобладали следующие: ощущение сухости губ и сухость во рту (57% пациентов), привкус кислого и горького в утренние часы и при изжоге (60% пациентов). Чувство жжения и боль в языке беспокоили 20—32% пациентов, что сочеталось с обложенностью языка (74% пациентов). Десквамативные изменения языка определялись у 28—32% пациентов.

После проведения комплексного лечения пациентов с применением зубной пасты Parodontax-F и Эмалана отмечены положительные сдвиги в клинической симптоматике со стороны полости рта: отсутствие жалоб на ощущение горького и кислого во рту, исчезновение сухости слизистой оболочки полости рта и губ. Чувство жжения и боль в языке исчезали одновременно с прекращением изжоги и отрыжки. Результаты индексной оценки состояния пациентов исследуемых групп до и после лечения представлены в табл. 1.

Как следует из табл. 1, до начала лечения ИГ и WTC статистически значимо не различались между пациентами трех групп ( $p > 0,05$ ). Обнаружены статистически значимые межгрупповые отличия показателей ПИ и РВИ ( $p < 0,001$ ). При этом у пациентов третьей группы отмечены наихудшие значения ука-

Таблица 1

Индексы гигиены, пародонтальные индексы и индексы налета языка у пациентов с ГЭРБ до и после лечения (n = 75)

Группа пациентов	Индекс							
	ИГ		ПИ		РВИ (%)		WTC	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Группа 1 (n = 25)	2,17 ± 0,14	1,06 ± 0,07	0,97 ± 0,06	0,42 ± 0,03	18,36 ± 0,96	7,07 ± 0,39	7,10 ± 0,21	2,74 ± 0,11
Группа 2 (n = 25)	2,19 ± 0,17	0,79 ± 0,14	1,40 ± 0,05	0,43 ± 0,02	24,04 ± 1,47	6,70 ± 0,41	7,12 ± 0,24	1,94 ± 0,09
Группа 3 (n = 25)	2,27 ± 0,18	0,26 ± 0,02	1,60 ± 0,07	0,30 ± 0,02	45,48 ± 1,56	6,70 ± 0,50	7,48 ± 0,26	1,27 ± 0,07
p	0,14	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,85	0,48	<0,001

Таблица 2

Вкусовое восприятие у пациентов с ГЭРБ по показателям густометрии до и после лечения (n = 75)

Вещество	Норма [7]	Группа 1 (n = 25)		Группа 2 (n = 25)		Группа 3 (n = 25)	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Сладкое	0,25—1,25%	1,23 ± 0,45	0,84 ± 0,12	1,63 ± 0,41	0,80 ± 0,09	1,19 ± 0,43	0,85 ± 0,35
p		0,36		0,01		0,005	
Соленое	0,25—1,25%	1,80 ± 0,41	0,69 ± 0,15	2,05 ± 0,38	0,80 ± 1,14	1,84 ± 0,37	0,63 ± 0,14
p		0,008		0,008		0,005	
Кислое	0,05—1,25%	2,15 ± 0,23	0,89 ± 0,15	1,83 ± 0,27	0,65 ± 0,17	2,15 ± 0,26	0,72 ± 0,09
p		0,005		0,008		0,005	
Горькое	0,0001—0,003%	0,0034 ± 0,0006	0,0019 ± 0,0005	0,0029 ± 0,0006	0,0016 ± 0,0006	0,0038 ± 0,0009	0,0021 ± 0,0004
p		0,09		0,23		0,06	

занных индексов, что было учтено в дальнейшем при анализе результатов лечения.

После проведения терапии значения ИГ, ПИ и WTC имели статистически значимые различия между пациентами обследуемых групп ( $p < 0,001$ ). Достоверных межгрупповых отличий показателя РВИ не обнаружено ( $p = 0,85$ ). Однако, принимая во внимание исходно худшие показатели данного индекса до лечения обследуемых третьей группы, полученные результаты свидетельствуют о большей эффективности терапии указанных пациентов.

Результаты оценки вкусового восприятия различных раздражителей у пациентов с ГЭРБ до и после лечения представлены в табл. 2.

Установлено, что лечение пациентов всех групп привело к восстановлению вкусовой чувствительности на все виды вкусовых раздражителей (табл. 2). Однако в большей мере это относилось к реакции на солёное и кислое. Выявленные особенности, по-видимому, обусловлены нормализацией рН полости рта, так как до проведения комплексной терапии повышение порогов указанных показателей зависело, в пер-

вую очередь, от обратного заброса кислоты из полости желудка [11].

До начала лечения пациенты всех групп демонстрировали естественное (не отличающееся от нормы) вкусовое восприятие горьких и сладких раздражителей. Существенных отличий данных показателей от исходных значений после окончания терапии не выявлено. Опубликованные научные данные позволяют предположить, что указанные особенности связаны с одинаковым механизмом восприятия человеком этих веществ [12].

Изменения функционального состояния различных отделов пищеварительного тракта в условиях голода и насыщения у пациентов с ГЭРБ сопровождались колебаниями уровня мобилизации и демобилизации вкусовых сосочков языка, что характеризует амплитуду ГЛР. Числовые значения полученных в нашем исследовании данных представлены в табл. 3, 4, 5.

Сравнительный анализ уровня мобилизации вкусовых сосочков языка показал, что данный показатель у всех обследованных групп пациентов с ГЭРБ до приема пищи — натошак — отличается от нормального значения как до, так и после проведения терапии (табл. 3).

Таблица 3

Показатели функциональной мобильности вкусовых сосочков языка у пациентов с ГЭРБ до и после лечения (n = 75)

Группа пациентов	Уровень мобилизации (%) в состоянии натошак (норма = 75–91%) [8]		Уровень мобилизации (%) после приема пищи (норма = 49–54%) [8]	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Группа 1 (n = 25)	68,0 ± 1,5%	72,0 ± 1,6%	74,0 ± 1,4%	73,0 ± 1,3%
Группа 2 (n = 25)	75,0 ± 0,6%	80,0 ± 0,8%	80,0 ± 1,5%	70,0 ± 1,6%
Группа 3 (n = 25)	70,0 ± 1,5%	75,0 ± 1,4%	84,0 ± 1,3%	70,0 ± 1,8%

Таблица 4

Уровень мобилизации вкусовых сосочков языка у пациентов с ГЭРБ натошак до и после лечения (n = 75)

Группа пациентов	Уровень мобилизации (%) в состоянии натошак (норма = 75–91%) [8]		Число и процент больных с отклонением уровня мобилизации от нормы натошак		p
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	
Группа 1 (n = 25)	68,0 ± 1,5%	72,0 ± 1,6%	19 (76,0%)	15 (60,0%)	<0,001
Группа 2 (n = 25)	75,0 ± 0,6%	80,0 ± 0,8%	11 (44,0%)	0 (0%)	
Группа 3 (n = 25)	70,0 ± 1,5%	75,0 ± 1,4%	17 (68,0%)	12 (48,0%)	

Таблица 5

Уровень мобилизации вкусовых сосочков языка у пациентов с ГЭРБ после приема пищи до и после лечения (n = 75)

Группа пациентов	Уровень мобилизации (%) после приема пищи (норма = 49–54%) [8]		Число и процент больных с отклонением уровня мобилизации от нормы после приема пищи		p
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	
Группа 1 (n = 25)	74,0 ± 1,4%	73,0 ± 1,3%	25 (100%)	25 (100%)	1,0
Группа 2 (n = 25)	80,0 ± 1,5%	70,0 ± 1,6%	25 (100%)	25 (100%)	
Группа 3 (n = 25)	84,0 ± 1,3%	70,0 ± 1,8%	25 (100%)	25 (100%)	

Установлено, что после лечения динамика уменьшения числа пациентов с нарушением уровня мобилизации вкусовых сосочков языка в состоянии натошак статистически значимо отличается между тремя выделенными группами обследуемых ( $p < 0,001$ , табл. 4). Снижение относительного количества пациентов с указанными отклонениями было наиболее выраженным в группе 2 (стандартная терапия + Parodontax-F + Эмалан) и особенно в группе 3 (стандартная терапия + Parodontax-F).

До лечения пациенты всех групп характеризовались повышенным относительно нормы уровнем мобилизации вкусовых сосочков языка после приема пищи (табл. 5). Статистически значимых межгрупповых отличий данного показателя до проведения терапии не выявлено ( $p = 1,0$ ). Проведение лечения не сопровождалось нормализацией мобилизации вкусовых сосочков языка у пациентов с ГЭРБ после приема пищи.

### Заключение

Результаты оценки функциональной мобильности вкусовых сосочков языка у пациентов с ГЭРБ свидетельствуют об извращении ГЛР, что является ценным диагностическим признаком при патологии пищеварительного тракта. Указанные особенности, по-видимому, связаны с тем, что проведение терапевтических мероприятий не приводит к полной нормализации функционального состояния полости рта и, главным образом, различных отделов желудочно-кишечного тракта.

Результаты нашего исследования указывают на возможность эффективной коррекции вкусового восприятия у пациентов с ГЭРБ. Учитывая патофизиологические особенности общего заболевания, представляется целесообразным включение зубной пасты Parodontax-F и Эмалана в комплексное лечение пациентов с ГЭРБ. Такой подход позволяет, в частности, добиться улучшения вкусового восприятия у пациентов с указанной патологией. Коррекция дисгевзии представляет собой важный показатель положительной динамики качества жизни пациентов.

### Список литературы

1. Кайбышева В.О., Труханов А.С., Ивашкин В.Т. Обсуждение проблемы гастроэзофагеальной рефлюксной болезни в материалах Всемирного гастроэнтерологического конгресса (Шанхай, 2013). *Российский журнал гастроэнтерологии гепатологии колопроктологии*. 2014; 3: 22-7.
2. Ивашкин В.Т., Шептутлин А.А. *Болезни пищевода и желудка*. М.: Медпресс-информ; 2002.

3. Колесников Л.Л. *Сфинктерология*. М.: ГЕОТАР-Медиа; 2008.

4. van Herwaarden M.A., Smout A.J. Diagnosis of reflux disease. *Baillieres Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2000; 14(5): 759-74.

5. Юренев Г.Л. *Внепищеводные проявления гастроэзофагеальной рефлюксной болезни*: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2007.

6. Маев И.В., Андреев Н.Г., Дичева Д.Т. Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь: от патогенеза к терапевтическим аспектам. *Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии*. 2013; 8: 30-4.

7. Vaezi M.F., Richter J.E. Role of acid and duodenogastroesophageal reflux in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology*. 1996; 111(5): 1192-9.

8. Будылина С.М., Смирнова В.М. *Руководство к практическим занятиям по нормальной физиологии*. М.: Издательский центр «Академия»; 2005. 245-6.

9. Зайко Н.С. К вопросу о вкусовой рецепции человека. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1955; 1: 7-10.

10. Зайко Н.С. *О взаимосвязи вкусового аппарата с некоторыми отделами пищеварительного тракта*: Тезисы и доклады 12-й научной сессии института питания АМН СССР. М.; 1958. 21-2.

11. Пустовойт Е.В., Поликанова Е.Н. Изменение показателей смешанной слюны у больных гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью на фоне антирефлюксной терапии. *Российская стоматология*. 2009; 3: 12-5.

12. Самойлов В.О. *Гетерогенность хемосенсорных систем*. Л.: Издательство «Наука»; 1983.

Поступила 05.05.15

### References

1. Kaibysheva V.O., Truhmanov A.S., Ivashkin V.T. Discussion of the problem of gastroesophageal reflux disease in proceedings of the world gastroenterology congress (Shanghai, 2013). *Rossiiskij zhurnal gastroenterologii gepatologii koloproktologii*. 2014; 3: 22-7. (in Russian)

2. Ivashkin V.T., Sheptutlin A.A. *Diseases of the esophagus and stomach*. M.: Medpress-inform; 2002. (in Russian)

3. Kolesnikov L.L. *Sphincterology*. M.: GEOTAR-Media; 2008. 5-9. (in Russian).

4. van Herwaarden M.A., Smout A.J. Diagnosis of reflux disease. *Baillieres Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2000; 14(5): 759-74.

5. Yurenev G.L. *Extraesophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease*: Diss. ... d-ra med. nauk. M.; 2007. (in Russian)

6. Maev I.V., Andreev N.G., Dicheva D.T. Gastroesophageal reflux disease: from the pathogenesis to therapeutic aspects. *Klinicheskie perspektivy gastroenterologii, gepatologii*. 2013; 8: 30-4. (in Russian)

7. Vaezi M.F., Richter J.E. Role of acid and duodenogastroesophageal reflux in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology*. 1996; 111(5): 1192-9.

8. Budylnina S.M., Smirnova V.M. *A guide to practical works in normal physiology*. M.: Izdatel'skii tsentr «Akademiy»; 2005. 245-6. (in Russian)

9. Zajko N.S. To the question of human taste reception. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*. 1955; 1: 7-10. (in Russian)

10. Zajko N.S. *On the relationship of the taste apparatus with certain parts of the digestive tract*. Tezisy i doklady 12-i nauchnoi sessii instituta pitaniya AMN SSSR. M.; 1958. (in Russian)

11. Pustovoit E.V., Polikanova E.N. A change in characteristics of mixed saliva in patients with gastroesophageal ref-

lux disease after anti-reflux therapy. *Rossijskaya stomatologiya*. 2009; 3: 12-15. (in Russian)

12. Samojlov V.O. *Heterogeneity of chemosensory systems*. L.: Izdatel'stvo «Nauka»; 1983. (in Russian)

Received 05.05.15

#### Сведения об авторах:

*Будылина Софья Михайловна*, д.м.н., проф. каф. нормальной физиологии ГБОУ ВПО МГМСУ им. А.И. Евдокимова, 119017, Москва, пер. Старомонетный, д. 5

*Дмитриева Лидия Александровна*, д.м.н., проф. кафедры пародонтологии ГБОУ ВПО МГМСУ им. А.И. Евдокимова, 127006, Москва, ул. Долгоруковская, д. 4, стр. 2, e-mail:

*Георгиева Ольга Алексеевна*, к.м.н., доцент, ассистент каф. пародонтологии ГБОУ ВПО МГМСУ им. А.И. Евдокимова, 127006, Москва, ул. Долгоруковская, д. 4, стр. 2

*Перцов Сергей Сергеевич*, д.м.н., зав. каф. нормальной физиологии ГБОУ ВПО МГМСУ им. А.И. Евдокимова, 119017, Москва, пер. Старомонетный, д. 5; зам. директора по научной работе, зав. лаб. системных механизмов эмоционального стресса ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8, e-mail: s.pertsov@mail.ru



Коненков В.И., Бородин Ю.И., Макарова О.П., Бгатова Н.П., Рачковская Л.Н.

## **Эффекты наноразмерных частиц карбоната лития на оксидантно-антиоксидантный статус опухолевой ткани при развитии гепатокарциномы-29**

ФБГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАН, 630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2

Оксидантно-антиоксидантный статус опухолевой ткани при спонтанном развитии гепатокарциномы-29 (Г-29) и в условиях многократного введения наноразмерных частиц карбоната лития ( $\text{НЧ Li}_2\text{CO}_3$ ) у мышей-самцов СВА изучали по уровню накопления продуктов липопероксидации (ПОЛ) способных взаимодействовать с 2-тиобарбитуровой кислотой и активности ферментов антиоксидантной защиты каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) с использованием спектрофотометра «SmartSpec Plus» (Bio-Rad, США). Развитие опухолевого процесса, вызванное инокуляцией клеток Г-29 в мышечную ткань правого бедра, приводила к двухфазному изменению активности процессов ПОЛ. В момент инвазии опухолевых клеток интенсивность ПОЛ снижалась в 2,4 раза по сравнению с контролем, в период максимального увеличения размеров опухоли активность ПОЛ возрастала в 2,1 раза и в терминальную фазу развития падала. В период активного роста опухоли зафиксировано значительное повышение активности каталазы и снижение активности СОД. Введение  $\text{НЧ Li}_2\text{CO}_3$  при развитии опухолевого процесса ингибировало активность ПОЛ в ткани, пораженной Г-29, в 2,4 раза, но не оказывало влияния на уровни активности каталазы и СОД. Таким образом, эффекты введения  $\text{НЧ Li}_2\text{CO}_3$  при развитии гепатокарциномы направлены на поддержание баланса между прооксидантами и антиоксидантами, что может помочь лимитировать малигнизацию предраковых клеток и опухолевый рост.

**Ключевые слова:** гепатокарцинома, наноразмерные частицы, карбонат лития, перекисное окисление липидов, супероксиддисмутаза, каталаза

Konenkov V.I., Borodin Yu. I., Makarova O.P., Bgatova N.P., Rachkovskaya L.N.

## **Effects of lithium carbonate nanosized particles on oxidant-antioxidant status in tumor tissue of hepatocarcinoma-29**

Federal State Budgetary Institution «Scientific Institution of Clinical and Experimental Lymphology»

Oxidant-antioxidant status in tumor tissue of male-mice CBA at spontaneous course of hepatocarcinoma-29 and after repeated injections of lithium carbonate nanosized particles was evaluated on changes of lipid peroxidation (LPO) products level reacted with 2-thiobarbituric acid (TBA) as indicator of oxidative stress and activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase enzymes as indicators of antioxidant defense by spectrophotometer SmartSpec Plus» (Bio-Rad, USA). Tumor development after hepatocarcinoma-29 cells injection into muscle right leg changed the levels of LPO activity in two-phase manner. TBA-active products content were decreased in 2,4 times in comparison with the control indicates after invasion of tumor cells, it was raised in 2,1 times at excessive tumor growth and diminished at terminal stage. Catalase activity was significantly elevated, but SOD activity was reduced in tumor tissue samples at active growth of hepatocarcinoma. The repeated injections of lithium carbonate nanosized particles at hepatocarcinoma inhibited processes of lipid peroxidation in tumor tissue in 2,4 times, but didn't influence on activities of catalase and SOD. Thus the effects lithium carbonate nanosized particles injections referred on maintenance of balance between the oxidant and antioxidants may be of some help to limit the progression of precancerous condition toward malignancy and tumor growth.

**Key words:** hepatocarcinoma, nanosized particles, lithium carbonate, lipid peroxidation, catalase, superoxide dismutase

Подобно другим солидным опухолям, гепатокарцинома характеризуется высокой степенью гетерогенности по морфологическим признакам, по степени дифференцировки и способности к пролиферации, а

также по чувствительности к противоопухолевым препаратам [1]. Среди клеток гепатокарциномы встречаются мультидрагрезистентные клетки, что существенно снижает эффективность традиционной терапии и повышает риск рецидивирования и летальных исходов [2], что диктует необходимость разработки новых терапевтических подходов к разрешению этой проблемы. Известно, что наноразмерные частицы

**Для корреспонденции:** Коненков Владимир Иосифович, акад. РАН, д.м.н., директор НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАН

(НЧ) обладают высокой цитотоксичностью [3]. В настоящее время НЧ металлов используют для усиления фотодинамической [4] и гипертермической терапии [5] гепатокарциномы. Площадь свободной поверхности материала в ультрадисперсном состоянии превышает площадь свободной поверхности вещества, сохраняющего высокую степень порядка, и в результате в твердом теле возникают новые физические явления и свойства, которых не было ранее и которые невозможно предсказать, исходя из строения и свойств массивного вещества [6, 7]. НЧ обладают высокоразвитой активной поверхностью, высокой сорбционной емкостью и благодаря своим размерам могут приближаться к биообъекту, взаимодействовать и связываться с ним [8]. Предполагается, что НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  токсичны для большинства подтипов опухолевых клеток, а также способны путем медленного растворения в микросреде клеток опухолевого узла, оказывать противовоспалительный эффект. Известно, что в прогрессировании рака печени не менее важную роль играет воспалительная реакция [9]. Показано, что  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  обладает противовоспалительным действием за счет усиления деградации белка p105 в макрофагах, являющегося прекурсором транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B — индуктора экспрессии провоспалительных генов, а также индукции апоптоза этих клеток [10]. Хроническое воспаление предрасполагает к развитию гепатокарциномы благодаря окислительному стрессу, стимулирующему гепатоканцерогенез [11]. Основным проявлением окислительного стресса может считаться усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ), которое является типовым ответом клеток и тканей на повреждающий агент [12]. Активность процессов ПОЛ определяется состоянием системы антиоксидантов в тканях. Цель исследования — изучение влияния НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  на активность процессов ПОЛ и антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы при развитии гепатокарциномы-29 (Г-29).

### Методика

Исследование проведено на мышах-самцах линии СВА массой 18—20 г в возрасте 3 мес. Животных содержали на стандартной диете со свободным доступом к воде и пище. Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». В эксперименте использовано 4 группы животных. В 1-ю группу вошли интактные мыши. Животные 2-й группы получали внутримышечно (в/м) 0,1 мл взвеси НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  в дозе 0,058 мг, приготовленной на стерильном 0,85% водном растворе NaCl. НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  диаметром 10—20 нм были получены путем механо-

активации образцов в мельнице-активаторе планетарного типа АГО-2С (разработка ИХТТМ СО РАН, г. Новосибирск) при частоте вращения барабанов — 1820 об/мин<sup>1</sup> и центробежном ускорении — 400 м/с<sup>2</sup>. Мелющими телами являлись стальные шары диаметром 8—10 мм. Масса шаров при загрузке одного барабана — 0,2—0,5 кг, навеска образца — 15—20 г, время обработки — 2 минуты. Перед приготовлением суспензии НЧ простерилизовали нагреванием до 100°C 90 мин. Размер НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  был определен под электронным микроскопом с помощью компьютерной программы Image Tool. Забор материала для исследований проводили на 2-е сут. после 1-кратного введения НЧ, на 5-е сут. после 4-кратного введения и на 10-е, 13-е и 20-е сут. после 5-кратного введения. У животных 3-й группы опухолевый процесс индуцировали инокуляцией клеток Г-29. Клетки Г-29 получены и верифицированы сотрудниками Института цитологии и генетики СО РАН [13] и любезно предоставлена для нашего исследования. Клетки Г-29 перевивали мышам линии СВА в брюшную полость, через 10 сут. забирали асцитическую жидкость, разводили в 10-кратном объеме 0,85% раствора NaCl и вводили по 0,1 мл интактным животным в мышцу правого бедра. У животных 3-й группы забор материала производили на 3-и, 7-е и 13-е сут. после введения опухолевых клеток. Животным 4-й группы после индукции опухолевого процесса в мышце вводили НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  в указанной дозе 1-кратно (3 сут.) и 5-кратно (7 и 13 сут.). Многократное внутримышечное введение было выбрано с целью направленной доставки НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  к месту инициации опухолевого процесса, что дало возможность использовать препарат в пониженной концентрации и ограничить токсическое влияние лития на почки. Забор материала производили на 3-и, 7-е и 13-е сутки после введения опухолевых клеток.

Для определения активности ПОЛ образцы ткани правого бедра гомогенизировали на холоде в гомогенизаторе Поттера в 2 мл 0,85% водного раствора NaCl, содержавшего 0,1% ЭДТА, затем центрифугировали 15 мин при 4000 об/мин, супернатанты замораживали при 18°C. В гомогенатах определяли активность ПОЛ по концентрации продуктов взаимодействия с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [14] Концентрацию ТБК-активных продуктов измеряли при длине волны 532 нм и выражали в мкмоль/кг, принимая молярный коэффициент экстинкции равным  $1,56 \times 10^5$  моль<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>. Для оценки состояния ферментативного звена антиоксидантной системы определяли уровень активности каталазы и СОД. Активность каталазы оценивали по методу, основанному на способности  $\text{H}_2\text{O}_2$  образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс

Изменение концентрации ТБК-активных продуктов и активности каталазы, супероксиддисмутазы в мышечной ткани бедра после введения наноразмерных частиц карбоната лития ( $M \pm m$ )

Сроки исследования	Каталаза (U/100 мг ткани)	Супероксиддисмутазы (U/100 мг ткани)	ТБК-активные продукты (мкмоль/кг ткани)
1-я группа (4)	24,9 ± 7,7	162,9 ± 6,6	10,86 ± 0,87
2-е сут. (5)	97,7 ± 14,8**	144,4 ± 32,2	18,34 ± 1,63**
5-е сут. (4)	12,8 ± 6,3	52,8 ± 12,5*	6,15 ± 1,12**+
10-е сут. (5)	25,7 ± 6,1	135,5 ± 8,2*	15,76 ± 1,55**+
13-е сут. (4)	63,2 ± 5,8**	47,8 ± 11,3**	8,14 ± 2,72
20-е сут. (5)	55,1 ± 17,4	238,2 ± 52,2	13,07 ± 2,47

Примечание. \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$  по сравнению с показателями в 1-й группе; в скобках указано количество животных; + —  $p < 0,05$  по сравнению с предыдущим сроком исследования.

[15]. Измерение проводили при длине волны 410 нм и выражали активность в условных единицах (U) на 100 мг ткани, принимая молярный коэффициент экстинкции  $H_2O_2$  равным  $22,2 \times 10^6 M^{-1} cm^{-1}$ . Активность СОД в гомогенатах ткани определяли по методу, основанному на способности энзима конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные радикалы, образующиеся в результате аэробного взаимодействия НАДН и феназинметосульфата [16]. Количественные параметры протекающей реакции измеряли при длине волны 540 нм. За единицу активности принимали 50% торможение реакции восстановления нитросинего тетразолия, активность фермента выражали в U/100 мг ткани. Все измерения выполняли на спектрофотометре «SmartSpec Plus» (Bio-Rad, США).

Состояние мышечной ткани после введения НЧ  $Li_2CO_3$  документировалось морфологическими исследованиями. Для светооптического исследования биологические образцы мышечной ткани бедра фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заключали в парафин. Срезы толщиной 5—6 мкм, окрашивали гематоксилином Майера, эозином и заключали в канадский бальзам. Для изучения биологических образцов в просвечивающем режиме электронного микроскопа их фиксировали в 1% растворе  $OsO_4$  на фосфатном буфере ( $pH = 7,4$ ), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашивали толудиновым синим, изучали под световым микроскопом и выбирали необходимые участки тканей для исследования в электронном микроскопе. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 35—45 нм на ультратоме LKB-NOVA, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1010.

Результаты подвергали дисперсионному анализу ANOVA с последующей оценкой межгрупповых отличий по критерию Манна — Уитни.

### Результаты и обсуждение

При введении НЧ  $Li_2CO_3$  у животных 2-й группы развивались процессы деструкции в мышечной ткани бедра — области введения частиц. Через сутки после введения НЧ  $Li_2CO_3$  в область бедра животным в месте введения наблюдали скопления частиц и повышенное количество макрофагов, с литием в цитоплазме (рис. 1, 2 Б). Отмечали участки некроза мышечной ткани и признаки воспаления (рис. 2 В, Г). В результате повреждения мышечной ткани у животных 2 группы через 2 сут. после введения НЧ  $Li_2CO_3$  в область бедра активность ПОЛ в мышечной ткани усиливалась. Концентрация ТБК-активных продуктов в образцах повышалась в 1,7 раза по сравнению с контрольными показателями (табл. 1). К 5 сут. после 4-кратного введения НЧ содержание ТБК-активных продуктов снижалось в 1,8 раза по сравнению с контрольным уровнем и в 3 раза по

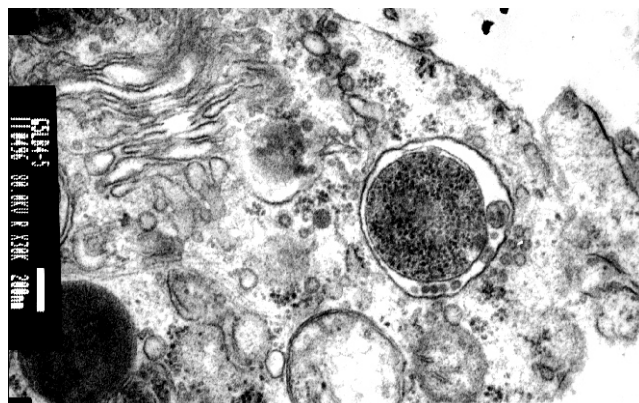


Рис. 1. Фагосома с НЧ  $Li_2CO_3$  в цитоплазме макрофага. Размер НЧ  $Li_2CO_3$  составляет  $14 \pm 3,12$  нм.



сравнению с показателями предыдущего срока (1-кратным введением). Через 10 сут. после 5-кратного введения НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  накопление ТБК-активных продуктов ПОЛ возобновилось, и их содержание в гомогенатах мышечной ткани бедра выросло в 1,5 раза по сравнению с контрольным уровнем и в 2,6 раза по сравнению с показателями предыдущего срока. К 13 сут. уровень ТБК-активных продуктов ПОЛ в гомогенатах возвращался к норме и не изменялся до конца исследования. Динамика концентрации вторичных продуктов ПОЛ после многократного введения НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  носила волнообразный характер, косвенно отражая первичное повреждение мышечной ткани НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  и ее вторичное повреждение за счет развития воспалительной реакции. Важную роль в ограничении повреждающего действия продуктов ПОЛ на клеточные мембраны играет ферментативное звено антиоксидантной системы, эффективность которого определяется сбалансированностью активности СОД, инактивирующей супероксид анион-радикал и каталазы, инактивирующей  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Подавление активности одного из ферментов антиоксидантной системы может привести к избыточному накоплению активных форм кислорода, интенсификации процессов ПОЛ и деструкции клеток. После 1-кратного введения НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  на 2 сут. активность каталазы в мышечной ткани повышалась в 4,3 раза по сравнению с контрольным уровнем (табл. 1). В то же

время 4-кратное введение суспензии НЧ (5 сут.) ингибировало рост активности каталазы, и ее показатели были в 7,6 раза ниже, чем после 1-кратного введения и не отличались от нормы. На 10-е сут. после 5-кратного введения НЧ активность каталазы находилась в пределах нормы, и вновь увеличивалась к 13 сут., превышая контрольный уровень в 2,3 раза. К 20 сут. активность каталазы вновь возвращалась к норме. Динамика активности СОД после введения НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  отличалась от изменений уровня активности каталазы. Так, после 1-кратного введения НЧ на 2 сут. активность СОД не менялась, но после 4-кратного введения на 5 сут. уровень активности этого антиоксиданта падал в 3,1 раза по сравнению с контрольными значениями (табл. 1). После 5-кратного введения НЧ активность СОД на 10 и 13 сут. от начала исследования оставалась ниже нормы в 1,2 и 3,4 раза соответственно. На 20 сут. активность СОД возвращалась к норме. Динамика содержания ТБК-активных продуктов в мышечной ткани после введения НЧ была сопряжена с динамическими изменениями активности ферментативного звена антиоксидантной системы. Так, максимальное увеличение содержания ТБК-активных продуктов в мышечной ткани бедра на 2 сут. после 1-кратного введения НЧ сочеталось с компенсаторным повышением активности каталазы. Снижение концентрации вторичных продуктов ПОЛ после 4-кратного введения НЧ на

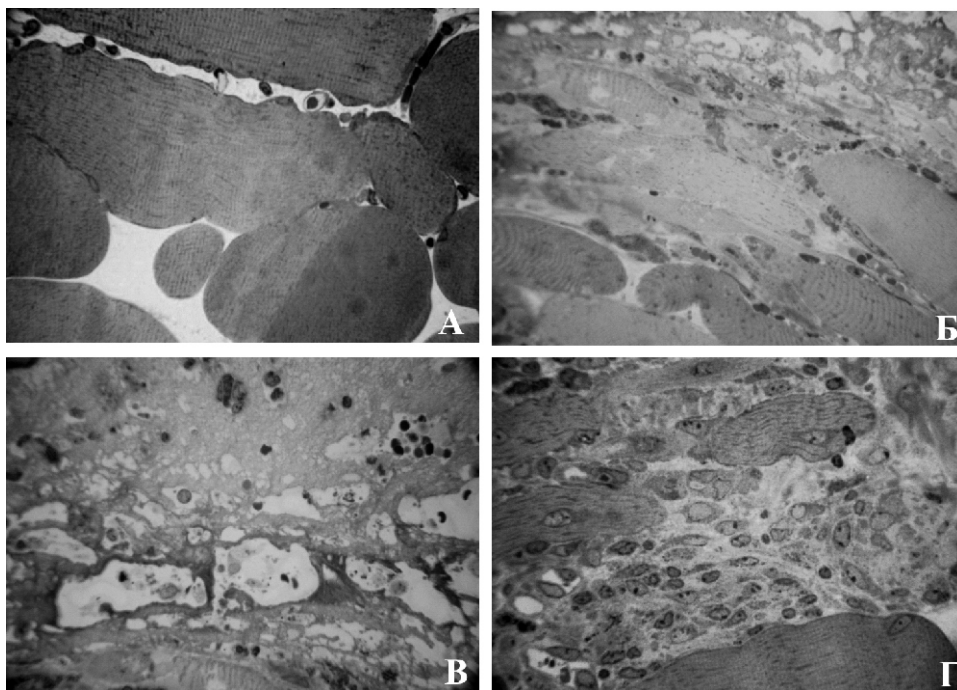


Рис. 2. Структура мышечной ткани через 1 сут. после введения наноразмерных частиц карбоната лития в бедро интактным животным: А — мышечная ткань бедра интактной крысы; Б — накопление НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  в цитоплазме макрофагов в области введения; В — некроз мышечного волокна; Г — развитие воспалительного процесса. Окраска толуидиновым синим. Увеличение 10х40.



5 сут. сочеталось с уменьшением активности каталазы и СОД. Повторное повышение активности ПОЛ на 10 сут. происходило на фоне пониженной активности СОД. Вновь последовавший рост активности каталазы на 13 сут. приводил к нормализации уровня показателей ПОЛ на последних сроках исследования.

Введение мышам 3 группы клеток гепатокарциномы 29 в правую мышцу бедра индуцировало развитие опухолевого процесса (рис. 3), морфологическое описание которого было сделано ранее [17]. При развитии опухоли в мышечной ткани правого бедра наблюдали существенные изменения свободнорадикального окисления липидов. На 3-и сут. после инициации неопластического процесса в мышце бедра мышей концентрация ТБК-активных продуктов снижалась в 2,4 раза по сравнению с уровнем этих продуктов у животных 1 группы (табл. 2). В последующие сроки исследования наблюдали повышение уровня вторичных продуктов ПОЛ в мышечной ткани: на 7-е сут. — в 2,1 раза, на 13-е сут. — в 1,4 раза относительно контрольных величин. Накопление продуктов ПОЛ в мышечной ткани после введения асцитной жидкости, видимо, связано с инвазией опухолевых клеток и повреждением мембранных структур миоцитов. Липоперекиси и продукты их распада могут вызывать повреждение мембранно-связанных ферментов и других макромолекул, включая ДНК, и способствовать быстрому развитию опухолевого процесса [14]. В терминальную фазу развития неопластического процесса (33-и сут.) уровень активности ПОЛ значительно снижался. Так, содержание ТБК-активных продуктов в этот период падало в 6,1 и 8,5 раза по сравнению с контрольными показателями и значениями, полученными на 13-е сут. Повышение концентрации ТБК-активных продуктов в мышечной ткани, пораженной Г-29, на 7-е сут. совпадало со снижением активности СОД, элиминирующей

супероксидный радикал, в 1,8 раза, а замедление роста их уровня на 13-е сут. сопровождалось более чем 3-кратным ростом активности каталазы (табл. 3).

Инъекции суспензии НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  непосредственно в пораженную ткань при развитии опухолевого процесса в правой мышце бедра вносили изменения в динамику активности процессов ПОЛ. Рост опухоли у мышей 4-й группы также подавлял процессы ПОЛ в ранний период, как и у животных 3-й группы (табл. 2). Однако в последующие сроки исследования у мышей 4-й группы уровень ТБК-активных продуктов в пораженной ткани бедра возвращался к норме, тогда как у животных 3-й группы происходило существенное накопление вторичных продуктов ПОЛ. На 7-е сут. у животных 4-й группы после 5-кратного введения НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ , концентрация ТБК-активных продуктов оказалась ниже в 2,4 раза величин показателей, наблюдаемых у мышей 3 группы (табл. 2). На 13-е сут. у животных 4-й группы уровень ТБК-активных продуктов находился в пределах нормы и был ниже в 1,4 раза показателей у мышей 3-й группы. Введение НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  существенно ингибировало активность ПОЛ в ткани, пораженной Г-29. Рост опухоли к 13-е сут. как у животных 4-й группы, так и 3-й группы сопровождался повышением активности каталазы, способной элиминировать  $\text{H}_2\text{O}_2$  из микроокружения опухолевых клеток и способствовать их активной пролиферации (табл. 3). Многократное введение НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  в область бедра при развитии опухолевого процесса не влияло на уровень и характер изменений активности каталазы и СОД в гомогенатах мышечной ткани на всех сроках исследования (табл. 3).

Таким образом, введение НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  активизировало ПОЛ в мышечной ткани, что приводило к первичной альтерации и развитию воспалительной инфильтрации, о чем свидетельствовали морфологи-

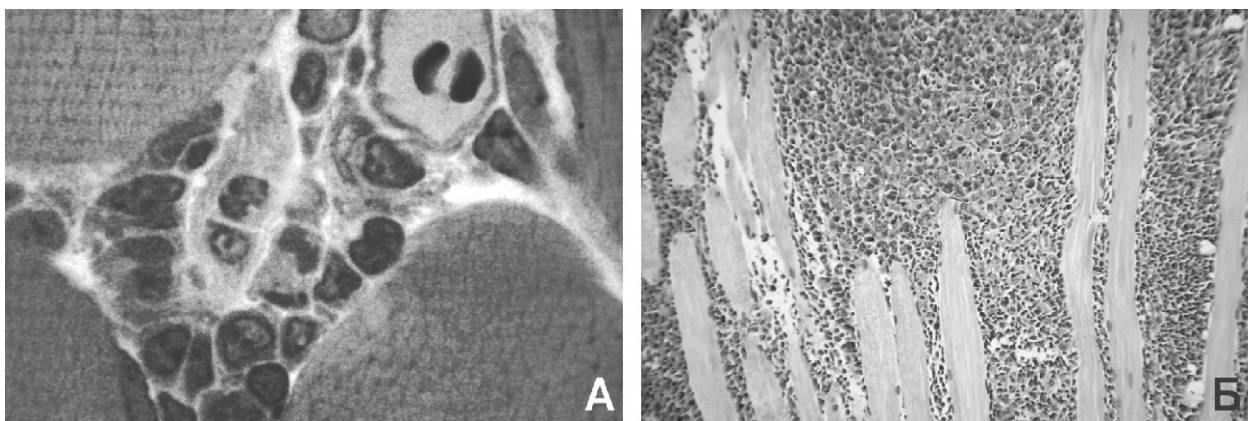


Рис. 3. Структура опухоли гепатокарциномы 29 в области бедра мышей линии СВА:

А — опухолевые клетки через 7-е сут. после имплантации клеток Г-29 в область бедра. Окраска толуидиновым синим. Увеличение 10х90; Б — плотное расположение клеток Г-29-е через 13-е сут. после имплантации в область бедра. Окраска по Ван Гизону. Увеличение 10х10.

Содержание ТБК-активных продуктов в мышечной ткани бедра при развитии опухолевого процесса в условиях введения наноразмерных частиц карбоната лития ( $M \pm m$ )

Сроки исследования	Группы животных	
	3-я группа	4-я группа
1 группа	10,86 ± 0,87 (4)	
3-и сут.	4,47 ± 1,37* (4)	5,06 ± 1,46* (4)
7-е сут.	23,2 ± 7,75 (3)	9,64 ± 1,39+ (5)
13-е сут.	15,18 ± 1,37*(4)	10,66 ± 2,12 (4)
33 сут.	1,79 (1)	3,21 (1)

Примечание. \* —  $p < 0,05$ , по сравнению с показателями в 1-й группе животных; + —  $p < 0,05$  по сравнению с показателями в 3-й группе животных; в скобках указано количество животных.

Изменение активности каталазы и супероксиддисмутазы в мышечной ткани бедра при развитии опухолевого процесса в условиях введения наноразмерных частиц карбоната лития ( $M \pm m$ )

Сроки исследования	Каталаза (U/100 мг)		Супероксиддисмутазы (U/100 мг)	
	3-я группа	4-я группа	3-я группа	4-я группа
1-я группа	24,9 ± 7,7 (4)		162,9 ± 6,6 (4)	
3-и сут.	23,7 ± 7,3 (4)	36,6 ± 12,6 (4)	152,1 ± 10,4 (4)	138,4 ± 66,1 (4)
7-и сут.	12,1 ± 6,5 (3)	23,7 ± 3,8 (5)	87,9 ± 19,5*(5)	74,9 ± 23,4** (3)
13-е сут.	91,4 ± 12,3*(4)	95,4 ± 12,8* (4)	107,2 ± 38,2 (4)	111,7 ± 35,1 (4)
33-и сут.	31,0 (1)	36,4 (1)	93,1 (1)	135,4 (1)

Примечание. \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$  по сравнению с показателями в 1-й группе животных; в скобках указано количество животных.

ческие изменения в мышечной ткани. Вслед за развитием воспаления после инъекций НЧ  $Li_2CO_3$  наступало вторичное повышение активности ПОЛ, по-видимому, связанное с фазой вторичной альтерации, вызванной высвобождением из клеток лизосомальных ферментов и активных метаболитов кислорода. Динамические изменения интенсивности ПОЛ оказались сопряжены с усилением активности каталазы и снижением активности СОД. Механизмы цитотоксичности НЧ, вероятно, связаны с усилением продукции реактивных метаболитов кислорода, преодолевающих антиоксидантную защиту, при соприкосновении поверхности частицы с мембраной клетки, а также при дальнейшем попадании в митохондрии, нарушение функционирования которых вызывает последующую гибель клетки [18]. Развитие опухолевого процесса после инокуляции клеток Г-29 в мышечную ткань правого бедра, приводило к двухфазному изменению активности ПОЛ: в момент инвазии опухолевых клеток интенсивность ПОЛ снижалась, в период значительного увеличения размеров опухоли активность ПОЛ возрастала и в терминальную фазу падала. Вероятно, снижение активности ПОЛ в мышечной ткани, пораженной опухолью, происходило в результате избыточного накопления одного из мощных антиоксидантов — каталазы. В период максимально-

го развития опухоли зафиксирован значительный рост активности каталазы и снижение активности СОД. Это свидетельствует о диспропорции образования супероксидного анион-радикала и перекиси водорода в трансформированных клетках опухоли, растущей в мышечной ткани бедра. Активатором каталазы в клетках гепатокарциномы служит транскрипционный фактор Oct-1, который связывается с промотором каталазы [19]. При развитии опухолевого процесса в условиях многократного введения НЧ  $Li_2CO_3$  активность процессов ПОЛ в ткани, пораженной Г-29, существенно снижалась, но активность антиоксидантных ферментов — каталазы и СОД оставалась неизменной. Эффекты НЧ  $Li_2CO_3$  на уровень ПОЛ в мышечной ткани, пораженной Г-29, видимо, обусловлены отчасти усилением апоптоза опухольассоциированных макрофагов, способных продуцировать активные метаболиты кислорода, индуцирующие ПОЛ, а также снижением их провоспалительной активности [10]. Таким образом, эффекты НЧ  $Li_2CO_3$  при развитии гепатокарциномы направлены на поддержание баланса между прооксидантами и антиоксидантами, что вероятно может помочь лимитировать малигнизацию предраковых клеток и опухолевый рост.

## Список литературы

1. Colombo F., Baldan F., Mazzucchelli S. et al. Evidence of distinct tumour-propagating cell populations with different properties in primary human hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2011; 6(6):e21369.
2. Gu W., Zhang Y.N., Li B., Han J. et al. Establishment of a multidrug-resistant cell line BEL-7402/5-FU of human hepatocellular carcinoma and its biological characteristics. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 2006; 4(3): 265-70.
3. Sycheva L.P., Zhurkov V.S., Iurchenko V.V. et al. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice in vivo. *Mutat Res*. 2011; 726(1): 8-14.
4. Rakovich A., Rakovich T., Kelly V. et al. Photosensitizer methylene blue-semiconductor nanocrystals hybrid system for photodynamic therapy. *J Nanosci Nanotechnol*. 2010; 10(4): 2656-62.
5. Raouf M., Curley S.A. Non-invasive radiofrequency-induced targeted hyperthermia for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Int J Hepatol*. 2011; 2011:676957.
6. Гусев А.И., Ремпель А.А. Нанокристаллические материалы. М.: Физматлит, 2001.
7. Суздаев И.П. Нанотехнология: физико-химия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов. М.: КомКнига, 2006.
8. Salata O.V. Applications of nanoparticles in biology and medicine <http://www.jnanobiotechnology.com/content/2/1/3>
9. Martin M., Herceg Z. From hepatitis to hepatocellular carcinoma: a proposed model for cross-talk between inflammation and epigenetic mechanisms. *Genome Med*. 2012; 4(1): 8.
10. Zhang M., Jin W., Yu J. et al. Dereglulation of Tpl2 and NF- $\kappa$ B signaling and induction of macrophage apoptosis by the anti-depressant drug lithium. *Cell Signal*. 2009; 21(4):559-66. doi:10.1016/j.cellsig.2008.12.010.
11. Bishayee A., Bhatia D., Thoppil R.J. et al. Pomegranate-mediated chemoprevention of experimental hepatocarcinogenesis involves Nrf2-regulated antioxidant mechanisms. *Carcinogenesis*. 2011; 32(6): 888-96.
12. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008.
13. Каледин В.И., Жукова Н.А., Николин В.П. и др. Гепатокарцинома-29 — метастазирующая перевиваемая опухоль мышей, вызывающая кахексию. *Бюлл. Экспер биол.* 2009; 148(12): 664-9.
14. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск: Издательство Челябинского государственного педагогического университета, 2000.
15. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лаб. дело*. 1988; 1: 16-8.
16. Fried R. Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide dismutase. *Biochimie*. 1975; 57(5):657-60.
17. Бгатова Н.П., Бородин Ю.И., Макарова В.В. и др. Влияние наноразмерных частиц карбоната лития на интактную мышечную ткань и опухолевый рост. *Бюлл. Экспер. биол.* 2014; 157(1): 102-7.
18. Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. 3 Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ Health Perspect*. 2005; Vol. 113: 823-39.
19. Quan X., Lim S.O., Jung G. Reactive oxygen species downregulate catalase expression via methylation of a CpG island in the Oct-1 promoter. *FEBS Lett*. 2011; 585(21):3436-41.

Поступила 10.07.14

## References

1. Colombo F., Baldan F., Mazzucchelli S. et al. Evidence of distinct tumour-propagating cell populations with different properties in primary human hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2011; 6(6):e21369.
2. Gu W., Zhang Y.N., Li B., Han J. et al. Establishment of a multidrug-resistant cell line BEL-7402/5-FU of human hepatocellular carcinoma and its biological characteristics. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 2006;4(3): 265-70.
3. Sycheva L.P., Zhurkov V.S., Iurchenko V.V. et al. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice in vivo. *Mutat Res*. 2011. Vol. 726, №1. 8-14.
4. Rakovich A., Rakovich T., Kelly V. et al. Photosensitizer methylene blue-semiconductor nanocrystals hybrid system for photodynamic therapy. *J Nanosci Nanotechnol*. 2010. Vol. 10, №4.2656-62.
5. Raouf M., Curley S.A. Non-invasive radiofrequency-induced targeted hyperthermia for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Int J Hepatol*. 2011; 2011:676957.
6. Gusev A.I. Nanocrystal materials/A.I. Gusev, A.A. Rempel. M.: PHYSMATLIT, 2001. (in Russian)
7. Suzdalev I.P., Nanotechnology: Physical Chemistry of Nanoclusters, Nanostructures and Nanomaterials. KomKniга, Moscow, 2006. (in Russian)
8. Salata O.V. Applications of nanoparticles in biology and medicine <http://www.jnanobiotechnology.com/content/2/1/3>
9. Martin M., Herceg Z. From hepatitis to hepatocellular carcinoma: a proposed model for cross-talk between inflammation and epigenetic mechanisms. *Genome Med*. 2012; 4(1): 8.
10. Zhang M., Jin W., Yu J. et al. Dereglulation of Tpl2 and NF- $\kappa$ B signaling and induction of macrophage apoptosis by the anti-depressant drug lithium. *Cell Signal*. 2009; 21(4):559-66. doi:10.1016/j.cellsig.2008.12.010.
11. Bishayee A., Bhatia D., Thoppil R.J. et al. Pomegranate-mediated chemoprevention of experimental hepatocarcinogenesis involves Nrf2-regulated antioxidant mechanisms. *Carcinogenesis*. 2011. Vol. 32, №6. P. 888-96.
12. Menshchikova E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z. Oxidative stress: pathological conditions and diseases. Novosibirsk: ARTA, 2008. (in Russian)
13. Kaledin V.I., Zhukova N.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Beliaev M.D., Baginskaya N.V., Litvinova E.A., Tolstikova T.G., Lushnikova E.L., Semenov D.E. Hepatocarcinoma-29, a Metastasizing Transplantable Mouse Tumor Inducing Cachexia. *Bull. Experim. Biol. Med*. 2009; 148(12): 664-9. (in Russian)
14. Volchegorskij I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L. Eksperimental'noe modelirovanie i laboratornaja ocenka adaptivnyh reakcij organizma. Chelyabinsk; Russia. 2000. (in Russian)
15. Koroliuk M.A., Ivanova L.I., Majorova I.G., Tokarev V.E. 1988. A method of determining catalase activity. *Lab. Delo*. 1988; 1:16-8. (in Russian)

16. Fried R. Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide dismutase. *Biochimie*. 1975;57(5): 657-60.

17. Bgatova N.P., Borodin Yu.I., Makarova V.V., Pozhidaeva A.A., Rachkovskaya L.N., Konenkov V.I. Effects of Nanosized Lithium Carbonate Particles on Intact Muscle Tissue and Tumor Growth. *Bull. Experim. Biol. Med.* 2014;157(1):102-7.

18. Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. 3 Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies

of Ultrafine Particles. *Environ Health Perspect.* 2005; 113: 823-39.

19. Quan X., Lim S.O., Jung G. Reactive oxygen species downregulate catalase expression via methylation of a CpG island in the Oct-1 promoter. *FEBS Lett.* 2011; 585(21): 3436-41.

*Received 10.07.14*

#### **Сведения об авторах:**

*Бородин Юрий Иванович*, д.м.н., акад. РАН, науч. консультант НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН

*Макарова Ольга Петровна*, д.биол.н., вед. науч. сотр., лаб. ультраструктурных исследований Института клинической и экспериментальной лимфологии СО РАН

*Бгатова Наталия Петровна*, д.биол.н., проф., руководитель лаб. ультраструктурных исследований Института клинической и экспериментальной лимфологии СО РАН

*Рачковская Любовь Никифоровна*, к.хим.н., руководитель лаб. биологически активных соединений НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАН



Митциев А.К.

## **Изменение активности перекисного окисления липидов как механизм развития патологии почек при действии тяжелых металлов**

ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России, 362019, Республика Северная Осетия Алания, Владикавказ, ул. Пушкинская, 40

Тяжелые металлы являются наиболее опасными антропогенными загрязнителями окружающей человека среды. Обладая обширным спектром патологических влияний, тяжелые металлы приводят к развитию необратимых изменений в тканях и системах живых организмов. Основным органом-мишенью деструктивного влияния металлов являются почки, что связано с особенностями выполняемых данным органом физиологических функций. Известно множество механизмов, позволяющих тяжелым металлам реализовывать свое патогенное влияние на организм, наиболее значимым среди которых, является механизм активации процессов свободно радикального окисления, ввиду присутствия тяжелым металлам прооксидантной активности. Исходя из этого, основной задачей экспериментального исследования явился анализ участия процессов перекисного окисления липидов в генезе изменений функции почек под влиянием тяжелых металлов. Для определения функционального состояния почек проводили изучение основных процессов мочеобразования, экскреции белка и осмолярности мочи. Об интенсивности процессов перекисного окисления липидов судили по концентрации малонового диальдегида и гидроперекисей в крови животных. Результаты исследования позволили установить, что длительное введение тяжелых металлов в организм экспериментальных животных приводит к развитию мощного окислительного стресса, характеризующегося увеличением содержания продуктов перекисного окисления липидов в крови животных. В работе установлено, что активизация процессов липопероксидации в условиях длительного введения тяжелых металлов сопровождается развитием выраженных нарушений функционального состояния почек. Выраженный антиоксидантный эффект мелатонина в условиях длительного отравления солями тяжелых металлов способствует снижению активности процессов липопероксидации, что, в свою очередь, ослабляет патологические эффекты ксенобиотиков на функциональное состояние почек. Полученные данные свидетельствуют, что активизация тяжелыми металлами процессов перекисного окисления липидов является одним из механизмов, приводящих к развитию патофизиологических изменений деятельности почек.

**Ключевые слова:** тяжелые металлы; почки; перекисное окисление липидов, мелатонин

Mitsiev A.K.

## **Change lipid peroxidation as a mechanism of renal disease under heavy metals**

State educational institution of higher professional education «North Ossetian State medical academy» of the Ministry of health of the Russian Federation, 362019, Republic of North Ossetia — Alania, Vladikavkaz, Pushkinskaja street, 40

Heavy metals are the most dangerous anthropogenic pollutants human environment. With an extensive range of pathological effects of heavy metals lead to the development of irreversible changes in the tissues of living organisms and systems. The main target organ destructive influence of metals are the kidneys, which is associated with the peculiarities of running these bodies physiological functions. There are many mechanisms allowing heavy metals to exercise their pathogenic effects on the body, the most significant of which is the mechanism of activation of free radical oxidation, due to the inherent heavy metals prooxidant activity. On this basis, the main objective of the pilot study was to investigate the influence of lipid peroxidation in the kidney function. To determine the functional state of the kidneys was performed to study the basic processes of urine formation, protein excretion and urine osmolarity. The intensity of lipid peroxidation was judged by the concentration of malondialdehyde and hydroperoxide in the blood of animals. Results of the study revealed that long-term administration of heavy metals in experimental animals leads to the development of a powerful oxidative stress, characterized by an increase in the content of lipid peroxidation products in the blood of animals. The paper found that the activation of lipid peroxidation in the conditions of long-term administration of heavy metals associated with the development of marked disorders of renal function. A strong antioxidant effect of melatonin in long-term poisoning with heavy metal salts reduces the activity of lipid peroxidation, which in turn weakens the pathological effects of xenobiotics on renal function. The findings suggest that the activation of heavy metals, lipid peroxidation is one of the mechanisms leading to the development of pathophysiological changes in the kidneys.

**Key words:** heavy metals; kidney; lipid peroxidation, melatonin

Для корреспонденции: Митциев Астан Керменович, к.м.н., ст. преподаватель каф. нормальной физиологии, e-mail: digur1985@mail.ru

В современном мире развитие любого живого организма происходит в условиях неблагоприятного экологического фона, связанного с поступлением и накоплением в окружающей среде различных ксенобиотиков, наиболее опасными среди которых, являются тяжелые металлы [1, 2]. Обладая широким спектром повреждающего действия, металлы легко проникают в организм, где и реализуют свои патогенные эффекты. Ввиду физиологических особенностей наиболее чувствительными к негативному влиянию поллютантов, в том числе и тяжелых металлов, являются почки [3, 4]. Известно, что в условиях хронического поступления тяжелых металлов в организм, патологические изменения в почках развиваются задолго до появления первых функциональных признаков нефропатии, что также подчеркивает опасность воздействия ксенобиотиков на организм. Токсическое действие тяжелых металлов на организм реализуется посредством запуска многочисленных патогенетических механизмов, но, по-видимому, наиболее значимым из них является активация процессов перекисного окисления липидов, приводящая к формированию мощного оксидативного стресса [5, 6].

В качестве средства, применяемого для профилактики длительной интоксикации тяжелыми металлами, нами был выбран синтетический аналог гормона эпифиза — «Мелаксен» фирмы Unipharm-USA. Мелатонин является одним из наиболее мощных антиоксидантов [7], поэтому оценка функционального состояния почек при его применении в условиях избыточного поступления металлов в организм может служить важным доказательством роли свободно радикальных процессов в генезе нарушения функций при действии тяжелых металлов. Таким образом, задачей настоящего исследования было изучение зависимости между развитием окислительного стресса и выраженностью функциональных изменений почек и сердечно-сосудистой системы у крыс.

### Методика

Работа выполнена на 105 крысах-самцах линии Вистар, массой 200—300 г. При проведении экспериментов руководствовались статьей 11-й Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964), «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г.).

Эксперименты проводились в 7 группах животных:

1-я группа — интактные животные, с введением фиксированного объема физиологического раствора;

2-я группа — животные с внутрижелудочным введением сульфата кадмия в дозе 0,5 мг/кг, в течение 30 дней;

3-я группа — животные с внутрижелудочным введением сульфата кадмия в дозе 0,5 мг/кг и интрагастральным введением мелаксена в дозе 10 мг/кг;

4-я группа — животные с внутрижелудочным введением хлорида ртути в дозе 0,5 мг/кг, в течение 30 дней;

5-я группа — животные с внутрижелудочным введением хлорида ртути в дозе 0,5 мг/кг и интрагастральным введением мелаксена в дозе 10 мг/кг;

6-я группа — животные с внутрижелудочным введением ацетата свинца в дозе 40 мг/кг, в течение 16 дней;

7-я группа — животные с внутрижелудочным введением ацетата свинца в дозе 40 мг/кг, и интрагастральным введением мелаксена в дозе 10 мг/кг.

По истечении сроков введения металлов и мелаксена, в условиях 6-часового спонтанного диуреза исследовали функциональное состояние почек, что включало определение объема диуреза (мл/час/100 г), скорости клубочковой фильтрации по клиренсу эндогенного креатинина (мл/час/100 г), относительной канальцевой реабсорбции воды (%), экскреции белка с мочой и осмолярности мочи. Животных забивали с использованием тиопенталового наркоза.

Концентрацию креатинина определяли на спектрофотометре PV1251C (ЗАО Solar, Минск, Беларусь) с помощью наборов «Креатинин-Агат», «ООО» «Агат-Мед» (Москва, Россия). Концентрацию белка определяли на спектрофотометре PV1251C (ЗАО Solar, Минск, Беларусь) по методу Лоури. Для определения осмотического давления мочи использовали метод криоскопии, измерения выполняли на миллиосмометре «OSMOMAT-2» (GONOTEC, Германия). Для изучения активности процессов перекисного окисления липидов определяли концентрацию малонового диальдегида в эритроцитах животных спектрофотометрическим способом (PV1251C) (ЗАО Solar, Минск, Беларусь), основанном на способности малонового диальдегида взаимодействовать с тиобарбитуровой кислотой, и концентрацию гидроперекисей в плазме крови способом, основанном на ультрафиолетовом поглощении липидов экстрактов крови с помощью спектрофотометрического набора «ТБК-АГАТ (Биоконт)» «Агат-Мед» (Москва).

Полученные результаты экспериментальных исследований статистически обработаны с применением критерия «t» Стьюдента методом вариационного анализа, с помощью программы Prizma 4.0.

## Результаты и обсуждение

Изучение активности перекисного окисления липидов в группе животных получавших длительное введение сульфата кадмия, позволило установить совокупную реакцию увеличения концентраций малонового диальдегида и гидроперекисей в крови экспериментальных животных, относительно интактных значений (табл. 1). На фоне сформировавшегося окислительного стресса отмечалось развитие нарушений функционального состояния почек, характеризовавшихся наличием выраженной полиурии, несмотря на одновременное снижение скорости клубочковой фильтрации. Рост диуреза у животных получавших кадмий, был обусловлен значительным снижением относительной канальцевой реабсорбции воды, по сравнению с интактным контролем (табл. 2). Увеличение экскреции белка в сочетании с уменьшением осмотического давления мочи (табл. 2) в группе животных получавших кадмий свидетельствовало о развитии структурных изменений почечной ткани. Применение мелатонина в условиях длительной кадмиевой интоксикации снижало интенсивность процессов свободнорадикального окисления, что подтверждалось уменьшением концентраций малонового диальдегида и гидроперекисей в плазме крови крыс, по сравнению с показателями группы животных получавших только кадмий (табл. 1). Снижение выраженности оксидативного стресса сопровождалось приростом канальцевой реабсорбции воды, что, в свою очередь, приводило к снижению объема спонтанного диуреза относительно значений группы животных получавших только кадмий. Снижение степени протеинурии в сочетании с приростом осмотического давления мочи также свидетельствовало о нефропротекторном эффекте мелатонина в условиях кадмиевой интоксикации по сравнению с показателями крыс получавших только кадмий (табл. 2).

Как и большинство ксенобиотиков, ртуть относится к металлам с переменной валентностью и при поступлении в организм оказывает мощное прооксидантное действие, что и было установлено в нашем эксперименте. В условиях сулемовой интоксикации происходило увеличение концентраций продуктов перекисного окисления липидов — малонового диальдегида и гидроперекисей в крови животных, по сравнению с показателями интактного контроля (табл. 1). Одновременно с развитием оксидативного стресса в группе животных получавших сулему, отмечалось увеличение объема спонтанного диуреза, что было связано с уменьшением относительной канальцевой реабсорбции воды по сравнению с фоновыми показателями (табл. 2). Длительное поступление ртути в организм экспериментальных животных приводило к росту экскреции белка с мочой и одновременному уменьшению осмолярности мочи, относительно интактных значений (табл. 2). Как и в условиях кадмиевой интоксикации, так и при ртутном отравлении, мелатонин

оказывал выраженный антиоксидантный эффект, характеризовавшийся снижением концентрации гидроперекисей в плазме крови и концентрации малонового диальдегида в эритроцитах животных, по сравнению с аналогичными показателями крыс, получавших только сулему (табл. 1). Снижение интенсивности процессов липопероксидации сочеталось с уменьшением выраженности нарушения функции почек. Мелатонин в условиях ртутной интоксикации способствовал уменьшению диуретического влияния ртути, относительно значений животных получавших только ксенобиотик (табл. 2). Прирост осмолярности мочи у животных, получавших мелатонин, в условиях сулемовой интоксикации свидетельствовал о некотором восстановлении концентрирующей функции почек, что наряду с уменьшением степени протеинурии подтверждало профилактическую эффективность мелатонина (табл. 2).

Полученные данные экспериментальных исследований позволили установить, что свинец в условиях длительного поступления в организм также приводил к активации процессов липопероксидации, что характеризовалось увеличением концентрации малонового диальдегида в эритроцитах и повышением уровня гидроперекисей в плазме крови животных, по сравнению с показателями интактного контроля (табл. 1). Развитие выраженного окислительного стресса сочеталось с наличием значительных почечных нарушений. Увеличение объема спонтанного диуреза в группе животных получавших свинец явилось следствием уменьшения канальцевой реабсорбции воды, несмотря на одновременное снижение скорости клубочковой ультрафильтрации, относительно значений фоновой группы животных (табл. 2). Одним из доказательств развития свинцовой нефропатии явилось наличие выраженной протеинурии, сочетавшейся со значительным снижением способности почечной ткани к концентрированию мочи по сравнению с фоновыми показателями (табл. 2). Оказывая ингибирующее влияние на прооксидантные эффекты свинца, мелатонин снижал выраженность процессов свободнорадикального окисления, приводя к уменьшению содержания малонового диальдегида в эритроцитах и концентрации гидроперекисей в плазме крови относительно значений животных изолированно получавших только свинец (табл. 1). Снижая интенсивность оксидативного стресса, мелатонин в условиях свинцовой интоксикации способствовал приросту канальцевой реабсорбции воды, что явилось причиной уменьшения объема диуреза, а одновременный прирост осмотического давления свидетельствовал о восстановлении способности почек к концентрированию мочи (табл. 2). Помимо данного эффекта, мелатонин способствовал уменьшению экскреции белка с мочой, относительно показателей группы животных получавших только свинец (табл. 2).

Влияние тяжелых металлов на концентрацию малонового диальдегида и гидроперекисей в плазме крови у крыс ( $M \pm m$ )

Условия опыта	Статистический показатель	Малоновый диальдегид (мкмоль/л)	Гидроперекиси (мкмоль/л)
I	II	III	IV
Фон	$M \pm m$	$70,97 \pm 1,769$	$2,16 \pm 0,15$
CdSO <sub>4</sub> в/ж	$M \pm m$	$97,3 \pm 1,67$	$4,57 \pm 0,17$
	p	*)	*)
CdSO <sub>4</sub> в/ж + мелатонин в/ж	$M \pm m$	$85,3 \pm 2,72$	$3,06 \pm 0,18$
	p	**) ##)	*) #)
HgCl <sub>2</sub> в/ж	$M \pm m$	$95,5 \pm 1,83$	$4,26 \pm 0,18$
	p	*)	*)
HgCl <sub>2</sub> в/ж + мелаксен в/ж	$M \pm m$	$83,62 \pm 2,72$	$2,93 \pm 0,16$
	p	*) ^^)	**) ^)
Pb в/ж	$M \pm m$	$91,6 \pm 1,243$	$3,85 \pm 0,147$
	p	*)	*)
Pb в/ж + мелатонин в/ж	$M \pm m$	$81,2 \pm 1,568$	$2,94 \pm 0,116$
	p	*) +)	*) +)

Примечание. (\*) — достоверное ( $p \leq 0,001$ ) изменение по сравнению с фоном; (\*\*) — достоверное ( $p \leq 0,05$ ) изменение по сравнению с фоном; (#) — достоверное ( $p \leq 0,001$ ) изменение относительно внутрижелудочного введения CdSO<sub>4</sub>; (##) — достоверное ( $p \leq 0,05$ ) изменение относительно внутрижелудочного введения CdSO<sub>4</sub>; (^) — достоверное ( $p \leq 0,001$ ) изменение относительно внутрижелудочного введения HgCl<sub>2</sub>; (^^) — достоверное ( $p \leq 0,05$ ) изменение относительно внутрижелудочного введения HgCl<sub>2</sub>; (+) — достоверное ( $p \leq 0,001$ ) изменение относительно внутрижелудочного введения Pb.

Влияние тяжелых металлов на основные процессы мочеобразования, экскрецию белка и осмолярность мочи у крыс ( $M \pm m$ )

Условия опыта	Статистический показатель	Процессы мочеобразования			Экскреция белка, мг/ч/100 г	Осмолярность мочи, осм/л
		Диурез	Скорость клубочковой фильтрации	Канальцевая реабсорбция воды, %		
		мл/ч/100 г				
Фон	$M \pm m$	$0,091 \pm 0,0032$	$18,76 \pm 0,53$	$99,51 \pm 0,024$	$1,395 \pm 0,049$	$2,406 \pm 0,08$
CdSO <sub>4</sub> в/ж	$M \pm m$	$0,152 \pm 0,005$	$15,23 \pm 0,14$	$99,0 \pm 0,03$	$3,879 \pm 0,03$	$1,309 \pm 0,029$
	p	*)	*)	*)	*)	*)
CdSO <sub>4</sub> в/ж + мелатонин в/ж	$M \pm m$	$0,135 \pm 0,001$	$16,47 \pm 0,09$	$99,18 \pm 0,004$	$3,198 \pm 0,021$	$1,660 \pm 0,017$
	p	*) ##)	*) #)	*) #)	*) #)	*) #)
HgCl <sub>2</sub> в/ж	$M \pm m$	$0,109 \pm 0,0025$	$15,13 \pm 0,28$	$99,29 \pm 0,016$	$3,652 \pm 0,093$	$1,582 \pm 0,063$
	p	*)	*)	*)	*)	*)
HgCl <sub>2</sub> в/ж + мелаксен в/ж	$M \pm m$	$0,102 \pm 0,0016$	$16,75 \pm 0,46$	$99,37 \pm 0,014$	$2,938 \pm 0,082$	$1,763 \pm 0,052$
	p	**) ^^)	**) ^^)	*) ^^)	*) ^)	*) ^)
Pb в/ж	$M \pm m$	$0,111 \pm 0,0035$	$15,86 \pm 0,42$	$99,30 \pm 0,017$	$3,41 \pm 0,152$	$1,56 \pm 0,073$
	p	*)	*)	*)	*)	*)
Pb в/ж + мелатонин в/ж	$M \pm m$	$0,098 \pm 0,0024$	$16,41 \pm 0,13$	$99,41 \pm 0,015$	$2,6 \pm 0,054$	$1,91 \pm 0,055$
	p	++)	*)	**) +)	*) +)	*) +)

Примечание. (\*) — достоверное ( $p \leq 0,001$ ) изменение по сравнению с фоном; (#) — достоверное ( $p \leq 0,001$ ) изменение относительно внутрижелудочного введения CdSO<sub>4</sub>; (##) — достоверное ( $p \leq 0,05$ ) изменение относительно внутрижелудочного введения CdSO<sub>4</sub>; (^) — достоверное ( $p \leq 0,001$ ) изменение относительно внутрижелудочного введения HgCl<sub>2</sub>; (^^) — достоверное ( $p \leq 0,05$ ) изменение относительно внутрижелудочного введения HgCl<sub>2</sub>; (+) — достоверное ( $p \leq 0,001$ ) изменение относительно внутрижелудочного введения Pb; (++) — достоверное ( $p \leq 0,05$ ) изменение относительно внутрижелудочного введения Pb.



Данные экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что тяжелые металлы в условиях длительного поступления в организм оказывают выраженный прооксидантный эффект и являются факторами, приводящими к развитию окислительного стресса. Процессы свободно радикального окисления ведут к деструкции клеточных структур вплоть до гибели клеток, что в свою очередь приводит к развитию функциональных нарушений. Прооксидантное действие кадмия, ртути и свинца вызывает развитие функциональных нарушений почек. Применение мелаксена существенно уменьшает выраженность функциональных нарушений, что позволяет считать активацию процессов перекисного окисления липидов одним из механизмов развития патологии почек при действии тяжелых металлов.

### Выводы

Являясь металлами с переменной валентностью кадмий, ртуть и свинец в условиях длительного отравления оказывают мощное прооксидантное действие, что приводит к увеличению концентраций продуктов перекисного окисления липидов. Формирование окислительного стресса сопровождается развитием нарушения функций почек. Применение мелатонина способствует подавлению липопероксидации и снижает интенсивность нарушения функции почек при длительном действии тяжелых металлов.

### Список литературы

1. Han L., Zhou R., Kuang X., Feng X., Chen M., Shen J. Study on lead-induced activation of rat renal interstitial fibroblasts and the related mechanisms. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2014; 24 (9): 713-8.
2. Solenkova N.V., Newman J.D., Berger J.S., Thurston G., Hochman J.S., Lamas G.A. Metal pollutants and cardiovascular disease: Mechanisms and consequences of exposure. *American Heart Journal*. 2014; 168 (6): 812-22.
3. Geier D.A., Carmody T., Kern J.K., King P.G., Geier M.R. A significant dose-dependent relationship between mercury exposure from dental amalgams and kidney integrity biomarkers: a further assessment of the Casa Pia children's dental amalgam trial. *Human and Experimental Toxicology*. 2014; 32 (4): 434-40.
4. Joshi M.D., Ayah R., Njau E.K., Wanjiru R., Kayima J.K., Njeru E.K. et al. Prevalence of hypertension and as-

sociated cardiovascular risk factors in an urban slum in Nairobi, Kenya: a population-based survey. *BMC Public Health*. 2014; 18 (14).

5. Notarache G., Arnesano F., Calo V., Meleleo D. Heavy metals toxicity: effect of cadmium ions on amyloid beta protein 1-42. Possible implications for Alzheimer's disease. *Biomaterials*. 2014; 27 (2): 371-88.

6. Yang H., Shu Y. Cadmium transporters in the kidney and cadmium-induced nephrotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16 (1): 1484-94.

7. Лилица Г.А., Заславская Р.М., Калинина Е.В. Эффективность метаболических препаратов в комплексном лечении пожилых больных постинфарктным кардиосклерозом и недостаточностью кровообращения. *Клин. медицина*. 2005; 3: 54-7.

Поступила 26.02.15

### References

1. Han L., Zhou R., Kuang X., Feng X., Chen M., Shen J. Study on lead-induced activation of rat renal interstitial fibroblasts and the related mechanisms. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2014; 24 (9): 713-8.
2. Solenkova N.V., Newman J.D., Berger J.S., Thurston G., Hochman J.S., Lamas G.A. Metal pollutants and cardiovascular disease: Mechanisms and consequences of exposure. *American Heart Journal*. 2014; 168 (6): 812-22.
3. Geier D.A., Carmody T., Kern J.K., King P.G., Geier M.R. A significant dose-dependent relationship between mercury exposure from dental amalgams and kidney integrity biomarkers: a further assessment of the Casa Pia children's dental amalgam trial. *Human and Experimental Toxicology*. 2014; 32 (4): 434-40.
4. Joshi M.D., Ayah R., Njau E.K., Wanjiru R., Kayima J.K., Njeru E.K. et al. Prevalence of hypertension and associated cardiovascular risk factors in an urban slum in Nairobi, Kenya: a population-based survey. *BMC Public Health*. 2014; 18 (14).
5. Notarache G., Arnesano F., Calo V., Meleleo D. Heavy metals toxicity: effect of cadmium ions on amyloid beta protein 1-42. Possible implications for Alzheimer's disease. *Biomaterials*. 2014; 27 (2): 371-88.
6. Yang H., Shu Y. Cadmium transporters in the kidney and cadmium-induced nephrotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16 (1): 1484-94.
7. Lilica G.A., Zaslavskaja R.M., Kalina E.V. Jeftektivnost' metabolicheskikh preparatov v kompleksnom lechenii pozhilijh bol'nyh postinfarktym kardiosklerozom i nedosta-tochnost'ju krovoobrashhenija. *Klin. medicina*. 2005; 3: 54-7.

Received 26.02.15

Дзугкоев С.Г., Можаева И.В., Отиев М.А., Маргиева О.И., Дзугкоева Ф.С.

## **Влияние L-карнитина, афобазола и их комбинации с L-аргинином на биохимические и гистологические показатели дисфункции эндотелия при кобальтовой интоксикации у крыс**

ФГБУН Институт биомедицинских исследований Владикавказского научного центра РАН, отдел патобиохимии, Россия, 362019, РСО-Алания, Владикавказ, ул. Пушкинская, 47

*Исследовано влияние L-карнитина и афобазола и их комбинации с L-аргинином на биохимические и гистологические показатели эндотелиальной дисфункции у крыс с кобальтовой интоксикацией. Полученными данными выявлены биохимические маркеры дисфункции эндотелия. Установлено, что у крыс с кобальтовой интоксикацией на фоне лечения происходило угнетение перекисного окисления липидов (ПОЛ), снижение концентрации малонового диальдегида (МДА) в эритроцитах, активация супероксиддисмутазы (СОД). Это сопровождалось повышением концентрации оксида азота (NO), доступности субстрата L-аргинина и, возможно, экспрессии eNOS на фоне L-карнитина и афобазола.*

**Ключевые слова:** перекисное окисление липидов, антиокислительная система, оксид азота, регуляторы экспрессии eNOS, гистология, афобазол, L-карнитин

Dzugkoev S.G., Mozhaeva I.V., Otiev M.A., Margieva O.I., Dzugkoeva F.S.

## **Effect of L-carnitine, afobazole and their combination with L-arginine on biochemical and histological indices of endothelial dysfunction in cobalt intoxication in rats**

ERAS Institute of Biomedical Research of RAS VSC, department of pathobiochemistry, Russia, 362019, Vladikavkaz, Pushkin's street 47

*The influence of L-carnitine and afobazole and their combination with L-arginine on biochemical and histological indices of endothelial dysfunction in rats with cobalt intoxication. The obtained data revealed biochemical markers of endothelial dysfunction. Found that in rats with cobalt intoxication during treatment occurred inhibition of lipid peroxidation (LPO), reduced the concentration of malondialdehyde (MDA) in erythrocytes, activation of superoxide dismutase (SOD). This was accompanied by increased concentrations of nitric oxide (NO), the availability of the substrate L-arginine and possibly the expression of eNOS in the background of L-carnitine and afobazole.*

**Key words:** lipid peroxidation, antioxidant system, nitric oxide, regulators of expression of eNOS, histology, afobazole, L-carnitine

Загрязнение среды обитания ксенобиотиками — одна из глобальных нерешенных проблем, актуальность которой еще более возросла в XXI веке. Среди ксенобиотиков важное место занимают тяжелые цветные металлы и их соли, которые в больших количествах поступают в окружающую среду и через органы пищеварения, дыхания, кожные покровы и слизистые в организм человека и животных [4].

Экотоксиканты воздействуют практически на все внутренние органы на молекулярном, клеточном, тканевом и системном уровнях. Эффективность воздей-

ствия во многом зависит от концентрации и длительности экспозиции токсического вещества, комбинации его с другими повреждающими факторами, предшествующего состояния здоровья человека и его иммунологической реактивности [1, 7].

Одним из таких металлов является кобальт, который широко используется в металлургической промышленности в виде сплавов в составе цветных тяжелых металлов. Вместе с выбросами, кобальт попадает во внешнюю среду, загрязняя почву, питьевую воду, открытые водоемы. Предельно допустимая концентрация кобальта в воздухе составляет 0,05—0,1 мг/дм<sup>3</sup>. Чистой считается вода, в которой содержание металла не превышает тысячных долей мг на дм<sup>3</sup>. В то же время, кобальт имеет важное биоло-

**Для корреспонденции:** Дзугкоев Сергей Гаврилович, д.м.н., ст. науч. сотр. отдела патобиохимии ФГБУН Института биомедицинских исследований ВНИЦ РАН, e-mail: patbiochem@mail.ru

гическое значение в природе и, как микроэлемент, необходим всем живым организмам. Он относится к числу биологически активных и всегда содержится в организме животных и в растениях [12]. Основной биологической ролью этого элемента считается его присутствие в молекуле водорастворимого витамина В<sub>12</sub>, в котором его массовая доля составляет — 4%. У человека и животных он является кофактором ряда жизненно важных ферментов. В то же время, повышенные концентрации соединений кобальта для организма человека и животных не являются безразличными, а вызывают патологические нарушения во внутренних органах и тканях. Избыточное поступление солей тяжелых цветных металлов, в частности, кобальта в организм является гено-, ферменто- и мембранотоксичным [2, 3, 7]. В основе повреждающего действия окислительного стресса при ангиопатиях различного генеза лежат изменения физико-химических свойств мембран клеток и структурно-функциональные изменения [6, 14]. В развитии этих нарушений играет значительную роль блокирование функционально активных групп, структурных белков и ферментов [5]. С некоторыми металлами, в частности со свинцом, кобальт в организме вступает в синергические связи, потенцируя их патологические воздействия [23].

Несмотря на многократное изучение токсичности кобальта остаются неизученными механизмы его повреждающего действия на клеточно-молекулярном уровне [16, 20].

Окислительный стресс, развивающийся на фоне интоксикации хлоридом кобальта, ассоциируется со снижением биодоступности оксида азота (NO) и развитием дисфункции эндотелия. Все вышеизложенное дает основание полагать, что необходимой составляющей оптимизации патогенетической терапии сосудистых осложнений, вызванных хлоридом кобальта, является поиск и испытание новых препаратов, обладающих способностью модулировать продукцию NO и ингибировать свободнорадикальное окисление. В последние годы в литературе появились данные о новом препарате — афобазоле (2-[2-(морфолино)этилтио]-5-этоксibenзимидазола гидрохлориде), синтезированном в ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН и оказывающим противоишемическое действие через  $\sigma_1$ -рецепторы [11, 19], защищая клетку от свободнорадикальной агрессии [8, 26, 29]. Не исключено, что подавление свободнорадикального окисления обусловлено способностью агонистов  $\sigma_1$ -рецепторов уменьшать активность индуцибельной NO-синтазы (iNOS), которая рассматривается как один из основных «медиаторов» повреждения эндотелия и ишемизированных кардиомиоцитов. Возможно, подавление агонистами  $\sigma_1$ -рецепторов активности

iNOS способствует увеличению синтеза конститутивной NO-синтазы — eNOS, которая способствует защите клеток от свободнорадикального повреждения [30, 24]. Вместе с тем, для подтверждения этих механизмов действия афобазола представляет научный интерес исследование влияния афобазола и L-аргинина, а также L-карнитина на показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ), метаболизма NO и гистопатоморфологические показатели при кобальтовой интоксикации.

*Цель исследования:* изучить влияние L-карнитина и афобазола, их комбинации с L-аргинином на биохимические и гистологические показатели функции эндотелия у крыс с кобальтовой интоксикацией.

### Методика

Исследования проведены на 120 крысах-самцах линии Вистар одной возрастной группы (10—14 мес.), массой 220—250 г. Содержание крыс в виварии и проведение экспериментов соответствовали «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», разработанным и утвержденным МЗ СССР (1977 г.), а также принципам Хельсинкской декларации (2000 г.).

Контрольную группу составили интактные животные (n = 20), по возрасту и массе сопоставимые с основной группой. Кобальтовую интоксикацию моделировали введением хлорида кобальта в дозе 2 мг/кг веса животного.

Подопытные крысы были разбиты на следующие группы:

1. Контрольная группа — интактные крысы (n = 20);
2. Крысы с кобальтовой интоксикацией без лечения (n = 20);
3. Крысы с кобальтовой интоксикацией, получавшие в течение 30 дней афобазол в дозе 10 мг/кг (n = 20);
4. Крысы с кобальтовой интоксикацией, получавшие в течение 30 дней L-карнитин в дозе 25 мг/кг (n = 20);
5. Крысы с кобальтовой интоксикацией, получавшие в течение 30 дней L-аргинин + афобазол (n = 20);
6. Крысы с кобальтовой интоксикацией, получавшие в течение 30 дней L-аргинин + L-карнитин (n = 20).

По окончании эксперимента под тиопенталовым наркозом у крыс забирали кровь из сердца, в гемолизате эритроцитов определяли концентрацию малонового диальдегида (МДА) [21] и активность супероксиддисмутазы (СОД) методом аутоокисления адреналина. В сыворотке крови каждой группы определя-

Динамика показателей ПОЛ — АОС и метаболитов оксида азота при кобальтовой интоксикации на фоне терапии афобазолом и L-карнитином

Показатель	Контроль	Со	Со + аргинин	Со + аргинин + афобазол	Со + аргинин + L-карнитин
МДА (эритроциты), нмоль/мл	4,55 ± 0,031	5,05 ± 0,033 <sup>1111)</sup>	4,86 ± 0,03 <sup>1111)</sup>	4,612 ± 0,008 <sup>2222)</sup>	4,796 ± 0,024 <sup>2222)</sup>
СОД (эритроциты), усл.ед.	88,28 ± 1,32	63,86 ± 1,27 <sup>1111)</sup>	65,4 ± 1,5 <sup>1111)</sup>	82 ± 0,707 <sup>2222)</sup>	75 ± 0,707 <sup>2222)</sup>
Каталаза (сыворотка крови) мкат/л	225,58 ± 25,78	370,2 ± 6,11 <sup>1111)</sup>	359,4 ± 6,8 <sup>1111)</sup>	269,4 ± 5,09 <sup>22)</sup>	319,2 ± 8,6 <sup>22)</sup>
Церулоплазмин (сыворотка крови), мг/л	338,6 ± 6,23	379,2 ± 6,57 <sup>1111)</sup>	359,8 ± 5,58 <sup>11)</sup>	355,5 ± 6,6 <sup>2)</sup>	356,4 ± 6,3 <sup>22)</sup>
NOx, (сыворотка крови), мкМ	51,1 ± 0,84	41,04 ± 0,04 <sup>1111)</sup>	43,14 ± 0,32 <sup>1111)</sup>	48,68 ± 0,421 <sup>2222)</sup>	44,88 ± 0,33 <sup>2222)</sup>

Примечание. <sup>1111)</sup> —  $p < 0,001$ ; <sup>111)</sup> —  $p < 0,01$ ; <sup>11)</sup> —  $p < 0,02$ ; <sup>1)</sup> —  $p < 0,05$  достоверность по сравнению с контролем; <sup>2222)</sup> —  $p < 0,001$ ; <sup>222)</sup> —  $p < 0,01$ ; <sup>22)</sup> —  $p < 0,02$ ; <sup>2)</sup> —  $p < 0,05$  достоверность по сравнению с кобальтовой интоксикацией без лечения

ли: активность СОД, каталазы [10], концентрацию церулоплазмينا [9] и суммарных метаболитов NO [13].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel 2006. Результаты представлены в виде среднего значения (Mean) и ошибки среднего (SEM). Статистическую достоверность различий между двумя группами животных проверяли с помощью t-критерия Стьюдента. Уровнем статистической значимости считали  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Исследования проведены на контрольных крысах (1-я группа), крысах с кобальтовой интоксикацией без лечения (2-я группа) и крысах с кобальтовой интоксикацией, получавших в течение 30 дней афобазол

по 10 мг/кг ежедневно парентерально (3-я группа) и крысах с кобальтовой интоксикацией, получавших в течение 30 дней L-карнитин по 25 мг/кг ежедневно парентерально (4-я группа). Через месяц парентерального введения хлорида кобальта развился окислительный стресс, сопровождающийся повышением концентрации МДА в мембранах эритроцитов. Одновременно происходило снижение активности СОД в эритроцитах, повышение активности каталазы и концентрации церулоплазмينا в сыворотке крови. У крыс с кобальтовой интоксикацией концентрация суммарных метаболитов NO статистически достоверно была ниже по сравнению с контрольными данными (таблица). Активные метаболиты кислорода и продукты ПОЛ вызвали нарушение функции эндотелия, биохимическими маркерами которого явились повышение концентрации МДА и снижение содержания суммарных метаболитов NO. Продукты ПОЛ вызвали повреждение сосудистого эндотелия, что подтверждено гистологически. Отмечается плазматическое пропитывание и умеренное утолщение эндотелия сосудов (рис. 1). Для коррекции избыточного процесса ПОЛ, нарушений системы антиоксидантной защиты, сниженной концентрации NO и гистологических изменений, животным с кобальтовой интоксикацией в течение 30 дней вводили афобазол, а другой группе L-карнитин в виде монотерапии и в комбинации с L-аргинином.

Результаты, представленные в таблице, свидетельствуют о существенном снижении концентрации МДА в крови под влиянием афобазола и L-карнитина. Анализ активности антиоксидантной системы показал достоверное возрастание активности СОД в эритроцитах, а повышенные данные активности каталазы и концентрации церулоплазмينا в сыворотке крови достоверно снизились, хотя активность катала-

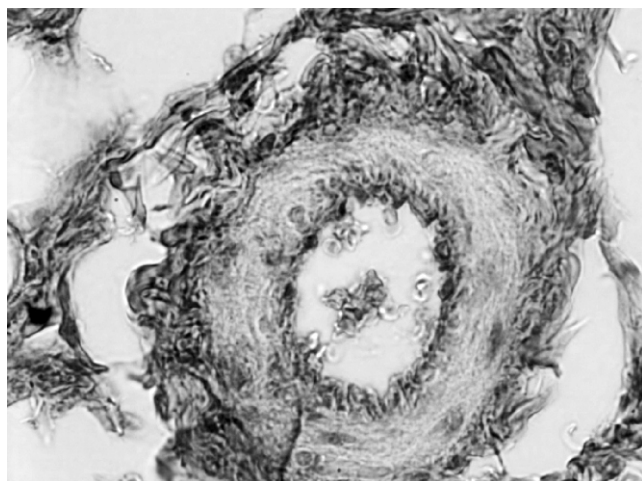


Рис. 1. Гистологическая структура сосудов микроциркуляторного русла у крыс с кобальтовой интоксикацией на фоне L-аргинина, кадр 42 x 900.



зы, по сравнению с контролем, осталась повышенной. В 3-й, 4-й группах крыс с кобальтовой интоксикацией на фоне лечения афобазолом и L-карнитином статистически достоверно повысилась в сыворотке крови концентрация оксида азота (таблица).

Эффективность влияния этих корректоров системы ПОЛ — АОС и содержание NO была более значимой при комбинации L-карнитина и афобазола с L-аргинином (5-я, 6-я группа крыс) (таблица). Для выяснения механизма повышения концентрации NO мы исследовали влияние L-аргинина — субстрата синтеза NO и ингибитора eNOS — L-NAME. Данные, представленные в таблице, демонстрируют нарастание концентрации суммарных метаболитов NO на фоне лечения афобазолом и L-карнитином и их комбинации с L-аргинином.

Полученные нами данные соответствуют результатам других исследователей [22, 25], показывающих, что супероксид анион радикал ( $O_2^-$ ) обладает способностью тормозить экспрессию и активность eNOS, а также связывать и инактивировать NO, превращая его в пероксинитрит. Более того, данные других авторов [28] подтверждают повышенное образование  $O_2^-$  в дыхательной цепи и возможность оксидативного поражения эндотелия сосудов при кобальтовой интоксикации [22].

Для выяснения эффективности действия антиоксидантов на процессы ПОЛ и активность ферментов АОЗ клеток был проведен корреляционный анализ. Представленные данные в 4-х группах животных, получавших лечение, показали наличие корреляционной зависимости между концентрацией МДА и активностью каталазы: на фоне L-карнитина и афобазола соответственно ( $r = +0,64$ ,  $r = +0,62$ ,  $\rho < 0,001$ ) и концентрацией ЦП ( $r = +0,59$ ,  $r = +0,57$ ,  $\rho < 0,001$ ) и обратной связи между уровнем снижения концентрации МДА и повышением активности СОД ( $r = 0,55$ ,  $r = 0,57$ ) одновременно было выявлено наличие отрицательной сильной связи показателей NO и МДА у леченных крыс соответственно ( $r = 0,60$ ,  $r = 0,58$ ,  $\rho < 0,001$ ). Полученные результаты позволяют заключить, что изучаемые препараты — афобазол, вводимый животным в течение месяца в дозе 10 мг/кг и L-карнитин в дозе 25 мг/кг, положительно влияли на функциональную активность эндотелия, что проявлялось усилением продукции оксида азота, эффект которого на гладкомышечные клетки (ГМК) сосудистой стенки реализуется через активацию растворимой гуанилатциклазы и повышение содержания цГМФ, что, в свою очередь, приводит к снижению внутриклеточного содержания  $Ca^{2+}$  и вазодилатации [17, 27]. Наибольшая эффективность афобазола на регуляторы экспрессии eNOS и концентрацию NO, полученные в наших исследова-

ниях при кобальтовой интоксикации, подтверждают предположение авторов [15, 18] о способности данных препаратов индуцировать экспрессию eNOS и, тем самым, нормализовывать концентрацию суммарных метаболитов NO, улучшая кровообращение в ишемизированных органах.

В сосудах микроциркуляторного русла отмечается частичное утолщение эндотелия сосудов. Гистологическая картина свидетельствует об увеличении числа эндотелиальных клеток и уменьшении межэндотелиальных щелей и плазматического пропитывания стенки сосуда (рис. 2).

Выявление защитного действия афобазола на интенсивность ПОЛ, метаболизм NO и гистологические проявления эндотелиальной дисфункции у крыс с кобальтовой интоксикацией согласуется с исследованиями Крыжановского С.А., Сорокиной А.В., Столярук В.Н. и др., 2010 [11], показавших способность данного препарата стимулировать пролиферативные процессы в миокарде, способствуя уменьшению площади ишемического повреждения. L-карнитин, в отличие от афобазола, обеспечивает транспорт ацилов в митохондрии, способствует образованию восстановленных эквивалентов, которые, окисляясь в дыхательной цепи, стимулируют энергообразование.

### Заключение

Изменение концентрации NO, участие регуляторов уровня экспрессии eNOS, а также показателей ПОЛ и АОС: концентрации МДА и активности ферментов СОД в эритроцитах, каталазы и концентрации церулоплазмينا в сыворотке крови являются

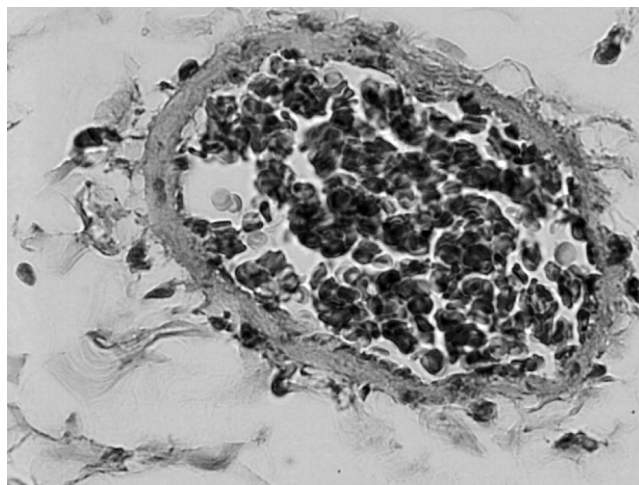


Рис. 2. Гистологическая структура сосудов микроциркуляторного русла у крыс с кобальтовой интоксикацией на фоне лечения афобазола + L-кар., кадр 6 x 900.

показателями эндотелиальной дисфункции, лежащей в основе сосудистых осложнений при экспериментальной модели токсической ангиопатии. Коррекция сосудистых осложнений, вызванных хлоридом кобальта, и метаболизма NO на фоне лечения афобазолом и L-карнитином, приводит к снижению интенсивности свободнорадикального окисления в эритроцитах, повышению активности СОД и концентрации стабильных суммарных метаболитов оксида азота в крови и, возможно, уровня экспрессии NO-продуцирующего фермента (eNOS) клеток сосудистого эндотелия. Наряду с биохимическими показателями, афобазол и L-карнитин способствуют восстановлению гистологической картины эндотелия сосудов у крыс с кобальтовой интоксикацией.

### Список литературы

1. Башилов А.В., Русланов А.Д. Изучение процессов окисления липидов методом моделирования. *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук*. 2009; 1(7): 42-4.
2. Бондаренко Л.В. Генетическая токсикология. *Экологическая генетика*. 2007; 5(1): 39-41.
3. Бурдин Н.В., Гребенникова В.В., Лебедев В.И., Монгуш А.А., Бурдин В.Н. Кобальт-никелевые арсенидные руды и проблемы биоэкологии; *Успехи современного естествознания*. 2008; 7:64.
4. Валина С.Л., Аминова А.И., Устинова О.Ю., Акатова А.А. Влияние химических факторов на клинико-лабораторные особенности атопических дерматитов. *Вестник Пермского университета*. 2010; 2:65-70
5. Гутникова А.Р., Махмудов К.О., Саидханов Б.А. и др. О мембранотропном действии солей тяжелых металлов и основных путях его коррекции. *Токсикол. Вестник*. 2002; 3: 21-26.
6. Дзугкоева Ф.С., Такоева Е.А. Можаяева И.В., Кочисова З.Х. и др. Состояние активности про- и антиоксидантной системы как факторов риска эндотелиальной дисфункции и почечной недостаточности у больных с хроническими болезнями почек (ХБН). *Успехи современного естествознания*. 2011; 12: 38-9.
7. Дзугкоева Ф.С., Такоева Е.А. Патобиохимические механизмы токсического влияния хлорида никеля в эксперименте у крыс. *Вестник новых медицинских технологий*. 2009; XVI(3): 36-7.
8. Дурнев А.А., Соломина А.С., Жанатаев А.К., Жуков В.Н., Серединин С.Б. Влияние афобазола на генотоксические эффекты табачного дыма в плаценте и в тканях эмбрионов крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2010; 150(9): 286-89.
9. Камышников В.С. *Клинико-биохимическая лабораторная диагностика*. 2003; 2:71-77.
10. Корольюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*; 1988; 1: 16-9.
11. Крыжановский С.А., Сорокина А.В., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., и др. Изучение антиишемического действия «Афобазола» в условиях экспериментального инфаркта миокарда. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*; 2010; 150(9): 284-86.
12. Мартынова С.Н., Горбач Т.В. Влияние солей кобальта на показатели энергетического обмена в митохондриях нефроцитов крыс. *Вест. Харьковского национ. университета имени В.Н. Каразина. Серия: биология*; 2009; 9(856).
13. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. *Клин. лаб. Диагностика*; 2005; 6: 15-18.
14. Микаэлян Н.П., Князев Ю.А., Гурина А.Е., Максина А.Г., Дзугкоева Ф.С. Состояние цитоплазматических мембран при экспериментальном сахарном диабете. *Сахарный диабет*. 1999; 3: 48-51.
15. Незнамов Г.Г., Сюняков С.А., Чумаков Д.В. и др. *Журнал неврол. и психиатр. им. С.С. Корсакова*. 2005; 105(4): 35-40.
16. Охрименко С.М., Гурьева Н.Ю., Калиман П.А. Адаптация ферментов липидного и азотистого обмена у крыс при оксидативном стрессе, вызванном солями кобальта и ртути. *Вестник Харьковского нац. унив. им. В.Н. Каразина*. 2005; 1-2(709).
17. Северин Е.С. Биохимия — М.: ГЕОТАР-МЕД. 4 издание (исправлен.); 2007; 779С.
18. Середенин С.Б., Воронин М.В. Нейрорецепторные механизмы действия афобазола. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2009; 72(1): 3-11.
19. Ajmo C.T.Jr., Vernon D.O., Collier L. et al. Sigma receptor activation reduces infarct size at 24 hours after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Curr. Neurovasc. Res*. 2006; 3(2): 89-98.
20. Anderson S.P.T. Nickel and cobalt: Their physiological action on the animal organism. *J. Anat. Physiol*. 1983; 17: 89-123.
21. Asakawa T., Matsushita S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test, for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*. 1980;15: 137-40.
22. Beckman J.S. *Circulat. Res*. 2001; 89: 295-7.
23. Berliner J.A., Heinecke J.W. *Free Radic. Biol. Med*. 1996; 20(5): 707-27.
24. Calvert J.W., Lefler D.J. *Cardiovasc. Res*. 2009; 83(2): 195-203.
25. Ferdinandy P., Schulz R. *Br. J. Pharmacol*. 2003; 183: 532-42.
26. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem*; 2006; 97(6): 1634-58.
27. Murad F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep*. 1999; 19: 133-54.
28. Rosca M.G., Mustata T.G. Kinter M.T. et al. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2005; 289(2): 420-30.
29. Tchedre K.T., Huang R.Q., Dibas A., Krishnamoorthy R.R., Dillon G.H., Yorio T. Sigma-1 receptor regulation of voltage-gated calcium channels involves a direct interaction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49(11): 4993-5002.
30. Vagnerova K., Hurn P.D., Bhardwaj A., Kirsch J.R. Sigma 1 Receptor Agonists Act as Neuroprotective Drugs Though Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Anesth. Anal*. 2006; 103(2): 430-4.

Поступила 26.02.15

### References

1. Bashilov A.V., Ruslanov A.D. Izuchenie protsessov okisleniya lipidov metodom modelirovaniya. *Aktual'nye problemy gumanitarnykh i estestvennykh nauk*. 2009; 1(7): 42-4. (in Russian)

2. Bondarenko L.V. *Geneticheskaya toksikologiya. Ekologicheskaya genetika*. 2007; 5(1): 39-41. (in Russian)
3. Burdin N.V., Grebennikova V.V., Lebedev V.I., Mongush A.A., Burdin V.N. Kobal't-nikelevye arsenidnye rudy i problemy bioekologii. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2008; 7:64. (in Russian)
4. Valina S.L., Aminova A.I., Ustinova O.Yu., Akatova A.A. Vliyanie khimicheskikh faktorov na kliniko-laboratornye osobennosti atopicheskikh dermatitov. *Vestnik Permskogo universiteta*. 2010; 2:65-70. (in Russian)
5. Gutnikova A.R., Makhmudov K.O., Saidkhanov B.A. i dr. O membranotropnom deystvii soley tyazhelykh metallov i osnovnykh putyakh ego korrektsii. *Toksikol. Vestnik*. 2002; 3: 21-6. (in Russian)
6. Dzugkoeva F.S., Takoeva E.A. Mozhaeva I.V., Kochisova Z.Kh. i dr. Sostoyanie aktivnosti pro- i antioksidantnoy sistemy kak faktorov riska endotelial'noy disfunktsii i pochechnoy nedostatochnosti u bol'nykh s khronicheskimi boleznymi pochek (KhBN). *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2011; 12: 38-9. (in Russian)
7. Dzugkoeva F.S., Takoeva E.A. Patobiokhimicheskie mekhanizmy toksicheskogo vliyaniya khlorida nikelya v eksperimente u krysa. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2009; XVI(3): 36-7. (in Russian)
8. Durnev A.A., Solomina A.S., Zhanataev A.K., Zhukov V.N., Seredinin S.B. Vliyanie afobazola na genotoksicheskie efekty tabachnogo dyma v platsente i v tkanyakh embrionov krysa. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*; 2010; 150(9): 286-89. (in Russian)
9. Kamyshnikov V.S. Kliniko-biokhimicheskaya laboratornaya diagnostika. 2003; 2:71-77. (in Russian)
10. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G. Metod opredeleniya aktivnosti katalazy. *Laboratornoe delo*. 1988; 1: 16-9. (in Russian)
11. Kryzhanovskiy S.A., Sorokina A.V., Stolyaruk V.N., Vititnova M.B., i dr. Izuchenie antiishemicheskogo deystviya «Afobazola» v usloviyakh eksperimental'nogo infarkta miokarda. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2010; 150(9): 284-86.
12. Martynova S.N., Gorbach T.V. Vliyanie soley kobal'ta na pokazateli energeticheskogo obmena v mitokhondriyakh nefrotsitov krysa. *Vest. Khar'kovskogo natsion. universiteta imeni V.N. Karazina. Seriya: biologiya*. 2009; 9(856). (in Russian)
13. Metel'skaya V.A., Gumanova N.G. *Klin. lab. Diagnostika*. 2005; 6: 15-8. (in Russian)
14. Mikaelyan N.P., Knyazev Yu.A., Turina A.E., Maksina A.G., Dzugkoeva F.S. Sostoyanie tsitoplazmaticheskikh membran pri eksperimental'nosakharnom diabete. *Sakhar-nyy diabet*. 1999; 3: 48-51. (in Russian)
15. Neznamov G.G., Syunyakov S.A., Chumakov D.V. i dr. *Zhurnal nevrologii i psikhiiatr. im. S.S. Korsakova*. 2005; 105(4): 35-40. (in Russian)
16. Okhrimenko S.M., Gur'eva N.Yu., Kaliman P.A. Adaptatsiya fermentov lipidnogo i azotistogo obmena u krysa pri oksidativnom stresse, vyzvannom solyami kobal'ta i rtuti. *Vestnik Khar'kovskogo nats. univ. im. V.N. Karazina*. 2005; 1-2(709).
17. Severin E.S. *Biokhimiya* — M.: GEOTAR-MED. 4 izdanie (ispravlen.); 2007; 779S.
18. Seredenin S.B., Voronin M.V. Neyroretseptornyye mekhanizmy deystviya afobazola. *Ekspertimetal'naya i klinicheskaya farmakologiya*; 2009; 72(1): 3-11. (in Russian)
19. Ajmo C.T.Jr., Vernon D.O., Collier L. et al. Sigma receptor activation reduces infarct size at 24 hours after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Curr. Neurovasc. Res*. 2006; 3(2): 89-98.
20. Anderson S.P.T. Nickel and cobalt: Their physiological action on the animal organism. *J. Anat. Physiol*. 1983; 17: 89-123.
21. Asakawa T., Matsushita S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test, for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*. 1980; 15: 137-40.
22. Beckman J.S. *Circulat. Res*. 2001; 89: 295-7.
23. Berliner J.A., Heinecke J.W. *Free Radic. Biol. Med*. 1996; 20(5): 707-27.
24. Calvert J.W., Lefler D.J. *Cardiovasc. Res*. 2009; 83(2): 195-203.
25. Ferdinandy P., Schulz R. *Br. J. Pharmacol*. 2003; 133: 532-42.
26. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem*. 2006; 97(6): 1634-58.
27. Murad F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep*. 1999; 19: 133-54.
28. Rosca M.G., Mustata T.G., Kinter M.T. et al. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2005; 289(2): 420-30.
29. Tchedre K.T., Huang R.Q., Diba A., Krishnamoorthy R.R., Dillon G.H., Yorio T. Sigma-1 receptor regulation of voltage-gated calcium channels involves a direct interaction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49(11): 4993-5002.
30. Vagnerova K., Hurn P.D., Bhardwaj A., Kirsch J.R. Sigma 1 Receptor Agonists Act as Neuroprotective Drugs Though Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Anesth. Analg*. 2006; 103(2): 430-4.

Received 26.02.15

**Сведения об авторах:**

Можсаева Ирина Викторовна, мл. науч. сотр. отдела патобиохимии ФГБУН Института биомедицинских исследований ВНИЦ РАН

Отиев Михаил Аврамович, мл. науч. сотр. отдела патобиохимии ФГБУН Института биомедицинских исследований ВНИЦ РАН

Маргиева Ольга Ивановна, мл. науч. сотр. отдела патобиохимии ФГБУН Института биомедицинских исследований ВНИЦ РАН

Дзугкoeва Фира Соломоновна, д.м.н., проф., зам. директора по НИР ФГБУН Института биомедицинских исследований ВНИЦ РАН



Усова Е.В.<sup>1</sup>, Копанцева М.Р.<sup>1</sup>, Егоров В.И.<sup>2</sup>, Копанцев Е.П.<sup>3</sup>, Свердлов Е.Д.<sup>3</sup>

## **Белки *SNAI1* и *SNAI2* — транскрипционные мастер-регуляторы эпителиально-мезенхимального перехода**

<sup>1</sup> — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Институт хирургии им. А.В.Вишневского» Минздрава России, 115093, Москва, ул. Большая Серпуховская, д. 27

<sup>2</sup> — Государственное бюджетное учреждение здравоохранения городская клиническая больница №5 Департамента здравоохранения г.Москвы, 107076, Москва, ул. Стромынка, д. 7

<sup>3</sup> — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

*Эпителиально-мезенхимальный переход является результатом клеточного эпигенетического перепрограммирования, в ходе которого дифференцированные эпителиальные клетки теряют маркеры эпителиальной принадлежности и начинают проявлять свойства низкодифференцированных мезенхимальных клеток, способных к локальной инвазии и обладающих повышенной устойчивостью к апоптозу. Несмотря на очевидную широкую биологическую и медицинскую значимость многие аспекты эпителиально-мезенхимального перехода, в особенности, касающиеся его генетической регуляции, остаются малоизученными. В данном обзоре мы рассматриваем молекулярную организацию и механизмы регуляции активности двух близкородственных транскрипционных факторов *SNAI1* и *SNAI2*, которые играют центральную роль в индукции и прогрессии эпителиально-мезенхимального перехода в нормальном развитии и канцерогенезе. Особое внимание уделяется роли факторов *SNAI1* и *SNAI2*, а также взаимодействующих с ними корепрессоров в инициации процесса эпигенетической репрессии генов эпителиальной дифференцировки.*

**Ключевые слова:** эпителиально-мезенхимальный переход, канцерогенез, трансформация, дифференцировка, транскрипция, эпигенетика

Usova E.V.<sup>1</sup>, Kopantseva M.R.<sup>1</sup>, Egorov V.I.<sup>2</sup>, Kopantzev E.P.<sup>3</sup>, Sverdlov E.D.<sup>3</sup>

## ***SNAI1* and *SNAI2* — transcriptional master-regulators of epithelial-mesenchymal transition**

<sup>1</sup> — A.V. Vishnevsky Institute of Surgery, Russian Federation, Moscow, 115093, Ul. Bolshaya Serpukhovskaya, 27

<sup>2</sup> — City Clinical Hospital №5 Moscow Health Department, Russian Federation, Moscow, 107014, Ul. Stromynka, 7

<sup>3</sup> — Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Russian Federation, Moscow, 117997, GSP-7, Ul. Miklukho-Maklaya, 16/10

*Epithelial-mesenchymal transition is a result of cellular epigenetic reprogramming. During this process differentiated epithelial cells lose specific markers of epithelial phenotype and gradually start displaying qualities of poorly differentiated mesenchymal cells, resistant to apoptosis and capable of local invasion. Despite their obvious importance for biology and medicine, many aspects of epithelial-mesenchymal transition, especially those related to its genetic regulation, remain poorly characterized. In this review we analyze molecular structure and mechanisms of regulation of two closely-related transcription factors *SNAI1* and *SNAI2*, which play an important role in induction and progression of epithelial-mesenchymal transition during both normal development and carcinogenesis. Special attention is paid to the role of *SNAI1* and *SNAI2* and their active co-repressors in initiation of epigenetic repression of epithelial differentiation marker genes.*

**Key words:** epithelial-mesenchymal transition, carcinogenesis, transformation, differentiation, transcription, epigenetics

В последние годы широкое внимание исследователей привлекает фенотипическая пластичность клеток при эмбриональном развитии, получившая название эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Этот процесс играет также чрезвычайную роль при

канцерогенезе особенно на стадиях метастазирования. Эпителиально-мезенхимальный переход (epithelial-mesenchymal transition, ЭМП) — биологический процесс обратимой фенотипической трансформации эпителиальных клеток, в результате которого они теряют свойства организованных в слои поляризованных клеток, снижают экспрессию специфических для эпителия белков межклеточных контактов и приобретают характерную для мезенхимальных клеток мор-

**Для корреспонденции:** Копанцев Евгений Павлович, к.биол.н., ст. науч. сотр. лаб. структуры и функции генов человека, ФГБУН ИБХ РАН, e-mail: kopantzev@ibch.ru



фологию и повышенную подвижность [1—3]. ЭМП является результатом клеточного эпигенетического перепрограммирования, в ходе которого дифференцированные эпителиальные клетки теряют маркеры эпителиальной принадлежности и начинают проявлять свойства низкодифференцированных мезенхимальных клеток, способных к локальной инвазии, направленной миграции, обладающих повышенной устойчивостью к апоптозу и синтезирующих белки внеклеточного матрикса характерные для клеток мезенхимального происхождения [3]. Многие аспекты ЭМП, в особенности, касающиеся его генетической регуляции, остаются малоизученными. В данном обзоре мы рассмотрим механизмы регуляции активности двух близкородственных транскрипционных факторов *SNAI1* (Snail) и *SNAI2* (Slug), которые играют центральную роль в индукции и прогрессии ЭМП в нормальном развитии и канцерогенезе.

### Общая характеристика ЭМП

ЭМП впервые был описан как эмбриональный процесс имеющий место на стадии имплантации эмбриона, гастрюляции и формирования подвижных клеток нервного гребня. Сейчас эти процессы, происходящие в ходе эмбрионального ЭМП, принято определять как ЭМП первого типа. На стадии гастрюляции ЭМП первого типа четко ограничен временными рамками эмбрионального развития и связан с фундаментальным процессом формирования первичной мезенхимы трехслойного зародыша [4]. На более поздних стадиях эмбриогенеза ЭМП также является ключевым процессом во многих гистогенных процессах, особенно у позвоночных, поскольку сердце, скелетно-мышечная система, большая часть черепно-лицевых структур и периферическая нервная система формируются благодаря этому механизму [5]. В частности, при развитии эмбриональной поджелудочной железы также наблюдается этот тип ЭМП — панкреатические эндокринные зародышевые клетки отсоединяются от эпителия и деламинированные клетки мигрируют через окружающую мезенхиму, после чего подвергаются обратному процессу мезенхимально-эпителиального перехода (mesenchymal-epithelial transition, МЭП), необходимому для формирования функциональных островков Лангерганса [6—7]. Для формирования некоторых органов структур, таких, как, например, сердечные клапаны, необходимо несколько последовательных ЭМП — МЭП циклов [8]. Процесс ЭМП, связанный с заживлением ран и регенерацией тканей, принято относить ко второму типу [2]. ЭМП второго типа, происходит как часть нормального процесса, связанного с заживлением и регенерацией поврежденной эпителиальной ткани —

адаптивным процессом, который обычно активирует фибробласты и родственные клетки для восстановления необходимой целостности тканей после травм и повреждения эпителиальных слоев. Хронический воспалительный процесс, приводящий к патологическому фиброзу органов, таких как почки, печень и легкие, часто сопровождается ЭМП второго типа, который часто приводит к формированию клеточных элементов и экстраклеточного матрикса фиброзной ткани [9—10]. Так, на мышинных моделях почечного фиброза показано, что около 30% фибробластов фиброзной ткани происходит из прошедших ЭМП тубулярных эпителиальных клеток [11]. Как правило, ЭМП второго типа в поврежденных тканях прекращается по мере снижения интенсивности локального воспаления и завершения репарационного процесса. В отличие от первых двух типов ЭМП, которые происходят с генетически нормальными клетками, ЭМП третьего типа связан с генетически и эпигенетически измененными неопластическими клетками [2]. Мутантные клетки многих эпителиальных опухолей (карцином) на определенных стадиях развития опухолевого процесса в результате неконтролируемого ЭМП приобретают способность к инфильтрации в окружающую нормальную ткань и иницируют процесс непрерывного метастазирования опухолевых клеток тем самым, создавая наиболее серьезные угрозы для жизни больных с онкологическими заболеваниями.

Фенотипическая трансформация эпителиальных клеток карцином в результате ЭМП приводит к значительным изменениям в морфологии, клеточной архитектуре, адгезивности, и в способности клеток к миграции.

### Генетические и эпигенетические характеристики ЭМП

Активирование ЭМП программы в раковых клетках изменяет экспрессию сотен генов [12—15], приводит к глобальному ремоделированию хроматина и перепрофилированию паттерна ДНК метилирования многих генов [16, 17]. Такой фундаментальный сдвиг клеточного фенотипа иницируются изменениями в уровнях экспрессии, стабильности и внутриклеточной локализации нескольких принципиальных белков — транскрипционных регуляторов ЭМП.

Важнейшим событием, сопровождающим процесс ЭМП всех трех типов, является прогрессирующее снижение уровня экспрессии гена *CDH1*, кодирующего белок  $Ca^{2+}$ -зависимых межклеточных контактов эпителиальных клеток E-кадгерин. Экспрессия гена *CDH1* критически связана с поддержанием клетками неинвазивного эпителиального фенотипа

[18—20]. Поэтому не удивительно, что транскрипционные репрессоры, связывающиеся с E-боксом (CANNTG) последовательностями ДНК внутри промоторной области гена *CDH1*, составляют большую часть группы белков транскрипционных мастер-регуляторов ЭМП [21]. К этим транскрипционным факторам, репрессирующим транскрипционную активность гена *CDH1* относятся такие белки, как TWIST1, TCF3 (E47), TCF4 (E2-2), ZEB1 ( $\delta$ EF2) и ZEB2 (SlP1) [22, 23]. Центральную роль в индукции и прогрессии всех трех типов ЭМП играют два родственных E-боксов связывающих белка SNAI1 (Snail) и SNAI2 (Slug) регуляции, активности которых посвящен наш обзор.

### Структура белков SNAI1 и SNAI2 и регуляция их активности

Эволюционно родственные белки SNAI1 и SNAI2 относятся к Snail суперсемейству транскрипционных факторов [24] с ДНК связывающими доменами, содержащими аминокислотные мотивы типа цинковые пальцы (Zinc-Finger motif, ZF-мотив). Описанный впервые в генетических экспериментах на дрозофиле ген *snail* (гомолог гена SNAI1 человека) оказался геном существенным для формирования мезодермы в раннем эмбриогенезе *Drosophila melanogaster* [25, 26]. Впоследствии гомологи гена *snail* были определены у всех исследованных позвоночных и беспозвоночных животных [27]. ДНК (E-боксов) связывающий домен белка SNAI1 человека (рис. 1) состоит из кластера четырех  $C_2H_2$  ZF-мотивов (ZF1-ZF4) и локализован на C-конце белка (154—259 аминокислота).  $C_2H_2$  ZF-участки белков SNAI1 и SNAI2 представляют классическую  $\beta\beta\alpha$ -пространственную структуру с  $\alpha$ -спиралью взаимодействующей с большой бороздкой ДНК [28]. Репрессорная активность Snail белков зависит от короткого расположенного на N-конце белков SNAI1 и SNAI2 (1—9 аминокислота) консервативного участка SNAG (Snail/Gfi) домена, который был впервые описан как репрессорный домен для Gfi1 белка [29] и обеспечивает связывание белков корепрессоров. Интересно, что SNAG домен отсутствует в гомологичных SNAI1 белках у *Drosophila melanogaster* и *Caenorhabditis elegans* (белки snail и ces1 соответственно) [27]. Аминокислотные последовательности центральной части SNAI1 и SNAI2 между SNAG-доменом и ДНК связывающими участками менее консервативны. Между SNAG-доменом и ZF-кластером белок SNAI1 содержит центральный серин-пролин богатый участок (S-P rich domain, SPR домен), лейцин богатый домен с сигналом ядерного экспорта (Nuclear Export Signal, NES-домен) и

домен дестабилизации (Destruction Box, DB-домен), находящийся внутри SPR участка. Сериновые остатки внутри SPR домена (90—120 аминокислота) SNAI1 важны для стабильности и внутриклеточной локализации белка, поскольку их замена с помощью мутагенеза на соответствующие аланины приводила к цитоплазматическому накоплению SNAI1 и его дисфункции как транскрипционного фактора [30]. Последовательность NES-домена обеспечивает распознавание SNAI1 транспортером CRM1 и после соответствующих посттрансляционных модификаций белка его эффективную транслокацию из клеточного ядра в цитоплазму [30—31]. Последовательность аминокислот DB-домена SNAI1 содержит важные для его функционирования остатки серина (S96 и S100), консервативна для нескольких регуляторных белков таких как IKK $\beta$ , ATF4, CDC25A и  $\beta$ -катенин [20] и определяет короткий период полужизни белка SNAI1 [31]. Данные о расположении внутри белка SNAI1 сигнала ядерной локализации (Nuclear Localization Signal, NLS) противоречивы. Так, в работе Ko et al. [32] NLS мотив был локализован в два разделенных участка последовательности SNAI1 (8—16 и 151—152 аминокислота). Мутационная инактивация этого предполагаемого NLS приводила к уменьшению количества ядерного SNAI1 и снижению его репрессорной активности [32]. Однако в работе других авторов было продемонстрировано, что главный NLS белка SNAI1 находится на C-концевой половине молекулы и может быть диспергирован по ДНК связывающей области SNAI1 и что основные аминокислотные остатки, составляющие NLS локализованы, по меньшей мере, в трех ZF-доменах белка [33]. NLS обнаруженный в C-концевой области белка SNAI1 связывается с несколькими ядерными белковыми транспортерами (импортином- $\beta$ KPNB1), импортином 7 (IPO7) и транспортинном) и обеспечивал транслокацию в ядро репортерного GFP конструктора [33, 34]. Этот диспергированный NLS мотив белка SNAI1, описанный Mingot et al [33], эволюционно консервативен и был выявлен в ZF-доменах у других членов семейства Snail белков (SNAI2, SNAI3 и Snail-like). Интересно отметить, что остатки основных аминокислот входящие в NLS белка SNAI1 (K161/K170, K187/R191 и K220/R224) не только обеспечивают взаимодействие с ядерными транспортерами, но и, по-видимому, принимают участие в связывании с ДНК последовательности E-боксов промоторной области гена *CDH1* [33].

Несколько различных клеточных протеинкиназ фосфорилируют многочисленные сериновые остатки внутри SPR домена (S92, S96, S100, S104, S107, S111, S115 и S119) белка SNAI1 [30, 35]. Сериновые остатки вне SPR домена SNAI1 (S11, S82, S203 и

S246) также могут подвергаться фосфорилированию [36, 35]. Эти модификации белка могут приводить к разнонаправленным изменениям его стабильности и внутриклеточной локализации. Серин/треониновая протеинкиназа GSK-3 $\beta$  была описана как важнейший негативный регулятор стабильности многих внутриклеточных белков, в том числе и ядерного SNAI1 [31, 37]. Предложены две отличающиеся в деталях модели GSK-3 $\beta$  регулируемой дестабилизации SNAI1. Согласно одной модели в эпителиальных клетках сериновые остатки (S107, S111 S115 и S119) NES фосфорилируются ядерной GSK-3 $\beta$ , что приводит к экспорту фосфорилированного SNAI1 из ядра клетки. Последующее фосфорилирование S96 и S100 внутри DB-домена белка цитоплазматической GSK-3 $\beta$  приводит к  $\beta$ -Тср-опосредованному распознаванию SNAI1 E3 убиквитин лигазным SCF комплексом, полиубиквитинированию белка и его протеасомной деградации [31]. Согласно другой модели, GSK-3 $\beta$  фосфорилирует первоначально S104 и S107 и лишь затем критические остатки DB-домена S96 и S100 [37]. Известно, что для эффективного фосфорилирования сериновых и треониновых остатков

внутри DB-мотива  $\beta$ -катенина для GSK-3 $\beta$  необходимо праймирующее фосфорилирование прилежащего серинового остатка в положении +4, которое обычно осуществляется кезин киназой 1 (CK1) [38]. Для активирования DB-мотива белка SNAI1 был также экспериментально продемонстрирован схожий эффект праймирующего фосфорилирования остатка S104 киназой CK1 $\epsilon$ , но не CK1 $\alpha$  [39]. Интересно отметить, что для эффективного фосфорилирования остатка S104 киназой CK1 $\epsilon$  необходимо присутствие в белке SNAI1 ДНК связывающего участка. Также авторами было показано, что остаток S104 является крайне неэффективным субстратом для GSK-3 $\beta$  и подавление экспрессии CK1 $\epsilon$  приводит к стабилизации функционального SNAI1 и репрессии активности гена *CDH1* [39]. Ингибирование активности GSK-3 $\beta$  в частности при активировании PI3K/Акт сигнального каскада может приводить к ядерной стабилизации SNAI1 и способствовать запуску процесса ЭМТ. Wnt сигнальный путь также может приводить к увеличению количества ядерного SNAI1 путем Axin-2 контролируемого экспорта GSK-3 $\beta$  из ядра

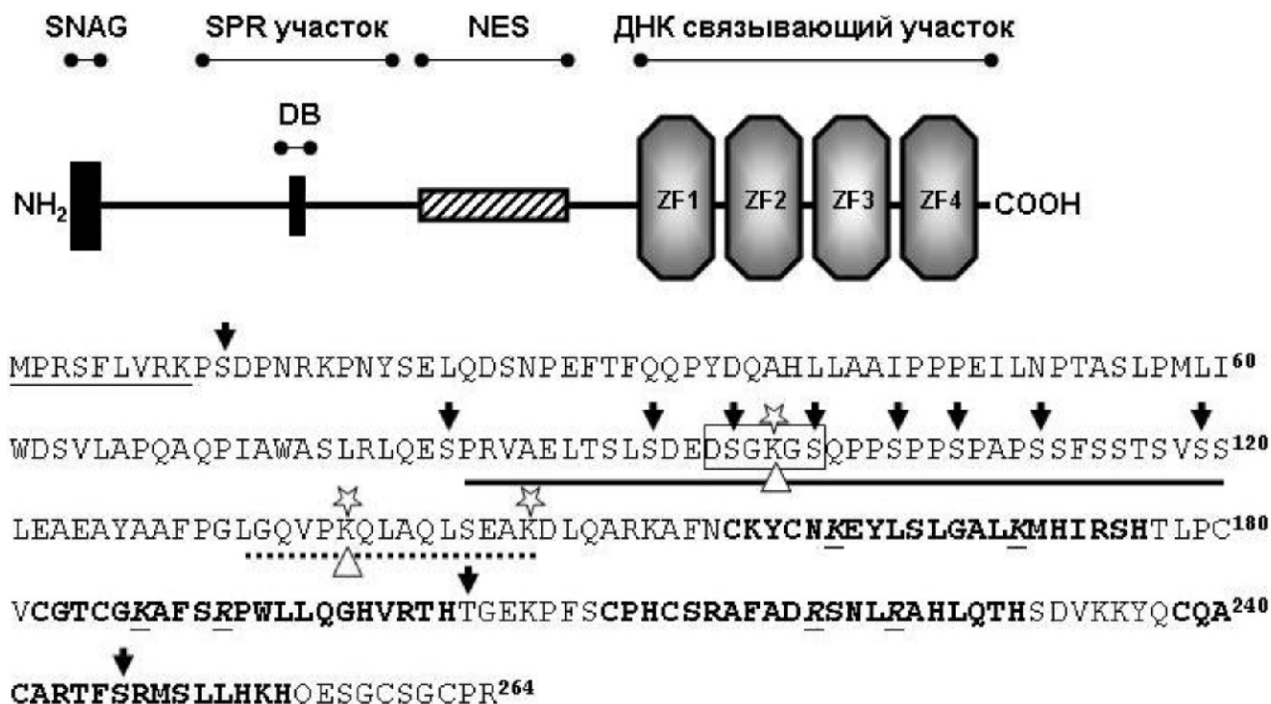


Рис. 1. Принципиальная модульная организация транскрипционного фактора SNAI1 и аминокислотная последовательность с указанием расположения функциональных участков и модифицируемых аминокислотных остатков. Жирным шрифтом указаны аминокислотные последовательности четырех C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-мотивов (ZF1-ZF4). Подчеркнутым жирным курсивом отмечены аминокислоты входящие в последовательность сигнала ядерной локализации (NLS). Тонкой сплошной линией подчеркнута аминокислотная последовательность SNAG домена белка SNAI1. Пунктирной линией подчеркнуты аминокислоты входящие в домен ядерного экспорта (NES участок). Жирной сплошной линией подчеркнута аминокислотная последовательность SPR (S-P rich domain) участка внутри, которого прямоугольником выделен домен дестабилизации (Destruction Box, DB-домен). Черными стрелками указаны аминокислоты, по которым происходит фосфорилирование белка SNAI1. Верхними звездочками и нижними треугольниками обозначены аминокислотные остатки лизинов белка SNAI1, по которым происходят убиквитинирование и окислительное деаминирование соответственно.



в цитоплазму [40]. Кроме того, было показано, что Wnt стимуляция клеток приводит к передислокации ядерной CK1 $\epsilon$  на цитоплазматическую мембрану [41], что дополнительно может стабилизировать белок SNAI1. Показано, что фармакологическое ингибирование активности GSK-3 низкомолекулярным агентом SB415286 приводит не только к внутриклеточному накоплению белка SNAI1, но и к повышению активности промотора и уровня экспрессии гена SNAI1. Последнее обстоятельство авторы объясняют активацией NF $\kappa$ B сигнального пути в клетках с ингибированным GSK-3 ферментом [42]. Таким образом, усиление или снижение фосфорилирующей активности CK1 и GSK-3 $\beta$  влияет на стабильность белка SNAI1 и в целом на процесс ЭМП. Также имеются указания на то, что в свою очередь белковые фосфатазы могут принимать участие в дополнительном регулировании стабильности ядерного SNAI1 и модуляции процесса EMT. Так был описан фермент SCP (small C-terminal domain phosphatase), который дефосфорилирует фосфорилированные GSK-3 $\beta$  остатки серина (S96, S100, S107, S111 S15 и S119) и тем самым ингибирует GSK-3 $\beta$ -зависимую деградацию SNAI1 и усиливает эффект ЭМП [43].

В дополнении к CK1 и GSK-3 $\beta$  было показано, что несколько других серин/треониновых киназ фосфорилируют SNAI1. Так, казеин киназа CK2 фосфорилирует остаток S92, который является важным для взаимодействия SNAI1 и mSin3A корепрессора [35]. Мутация S92A усиливает стабильность SNAI1 и значительно ослабляет репрессорную активность мутантного белка по отношению промотора гена *CDH1*. Расположенный непосредственно рядом со SNAG доменом остаток S11 фосфорилируется цАМФ-активируемой PKA, что позволяет предполагать, что эта модификация влияет на взаимодействия SNAI1 и белков корепрессоров. Также как и замена S92A мутация S11A усиливает стабильность SNAI1 и снижает репрессорную активность мутантного белка по отношению промотора гена *CDH1* и гена *CLDN1* [35]. Стоит отметить, что S11 находится внутри разделенного на две части (бипартитного) предполагаемого N-концевого NLS аминокислотного мотива описанного Ko et al. [32] для белка SNAI1, поэтому фосфорилирование S11 может влиять на транслокацию SNAI1 в ядро. В отличие от негативного эффекта на стабильность SNAI1 как в случае с GSK-3 $\beta$  другие киназы могут стабилизировать SNAI1 и усиливать его репрессорную активность по отношению к промотору *CDH1* и промоторам других эпителиальных генов. Так активируемая малыми ГТФ-азами Rac1 и Cdc42 серин/треониновая киназа Pak1 (известная как p21-активируемая киназа) фосфорилирует S246 расположенный в четвертом

ZF мотиве белка SNAI1 [36]. В клетках рака молочной железы фосфорилирование остатка S246 SNAI1 киназой Pak1 приводит к ядерной аккумуляции белка и индукции ЭМП процесса. Какой эффект на связывание SNAI1 с ДНК вызывает фосфорилирование остатка S246 к настоящему времени неизвестно. Повышенная активность Pak1, но не PKB (Akt1), наблюдается в протоковых карциномах молочной железы и коррелирует с инвазивным и низкодифференцированным фенотипом раковых клеток в опухоли [44]. При RNAi скрининге киназ, влияющих на стабильность биолюминесцентного репортерного Snail-CBG (Click Beetle Green) белка в клетках HEK293, была идентифицирована серин/треониновая киназа Lats2, которая участвует в Hippo сигнальном пути и является продуктом активности гена предполагаемого опухолевого супрессора *LATS2* [45]. Lats2 фосфорилирует белок SNAI1 по остатку треонина (T203) находящемуся в линкерной аминокислотной последовательности между ZF2 и ZF3 мотивами ДНК связывающего домена SNAI1. Фосфорилирование T203 остатка приводит к ядерной стабилизации SNAI1 и усилению ЭМП процесса [45]. Это несколько противоречит с данными других работ, в которых было показано, что Lats2 ослабляет ЭМП путем ингибирующего фосфорилирования транскрипционных коактиваторов TAZ и YAP [46, 47]. Однако, как справедливо было замечено, эффект на ЭМП может зависеть от внутриклеточной локализации активированной Lats2. Так, в ядре Lats2 киназа может усиливать ЭМП, фосфорилируя и стабилизируя SNAI1, а в цитоплазме ослабляет ЭМП, фосфорилируя свои цитоплазматические мишени TAZ и YAP [45].

Помимо регулирующего фосфорилирования, белок SNAI1 подвергается другим посттрансляционным модификациям. Так, при поиске белков взаимодействующих со SNAI1 было показано, что лизиновые остатки K98 и K137 белка SNAI1 важны для стабильности белка и взаимодействия с белками членами LOX семейства медь-содержащих ферментов лизил-оксидаз [48, 49]. LOX ферменты осуществляют окислительное деаминирование  $\epsilon$ -аминогрупп лизина в ряде определенных вне- и внутриклеточных белков [50]. Оверэкспрессия LOXL2 и LOXL3, но не LOXL4, в клетках MDCK индуцирует ЭМП процесс, связанный с приобретением трансфицированными клетками мезенхимального фенотипа и сниженной экспрессией гена *CDH1* [49]. Было предположено также, что LOXL2 может регулировать взаимодействие SNAI1 и GSK-3 $\beta$  и таким образом активно защищать SNAI1 от GSK-3 $\beta$ -индуцируемой деградации. К сожалению, в указанной работе авторы не показали присутствия действительно модифицированных лизиновых остатков в белке SNAI1. Однако если



подобные модификации имеют место, то они могут приводить к существенным изменениям в конформационной структуре, включая внутримолекулярные сшивки K98/K137, и в функции белка SNAI1 [48, 49]. Кроме того остатки K98 и K137 являются сайтами убиквитинилирования SNAI1 и их модификация LOXL2 и LOXL3 может изменять процесс деградации этого транскрипционного фактора. Как уже было сказано, деградация белка SNAI1 определяется GSK-3 $\beta$ -зависимым фосфорилированием DB мотива и осуществляется  $\beta$ -Тгср опосредованным полиубиквитинилированием фосфорилированного белка [31]. Также был описан механизм GSK-3 $\beta$ -независимого полиубиквитинилирования SNAI1 в условиях гипоксии и подавления ферментативной активности GSK-3 $\beta$  с помощью LiCl [51]. Авторы показали, что при этих условиях основным механизмом деградации SNAI1 является его взаимодействие с FBXL14 E3 убиквитин лигазой. Характерной особенностью гена *FBXL14* является его HIF1 $\alpha$ /TWIST1-зависимая репрессия в условиях гипоксии, что приводит к увеличению количества SNAI1 и индукции ЭМП в участках опухолей со сниженным содержанием кислорода [51]. Недавно было экспериментально продемонстрировано, что SNAI1 может быть субстратом для поли(АДФ-рибоза) полимеразы-1 (PARP-1), особенно в опухолевых клетках подвергнутых действию

ДНК-повреждающих препаратов типа доксорубин [52]. ПолиАДФ-рибозилирование SNAI1 увеличивает время жизни белка в клетках, а ингибирование активности PARP-1 фармакологическим препаратом KU0058948 ослабляет индуцированный ЭМП процесс, усиливает экспрессию гена *CDH1* и снижает инвазивность раковых клеток [52]. Необходимо также упомянуть работу [53], в которой было показано, что при культивировании клеток в гипергликемических условиях (25mM глюкозы) белок SNAI1 может подвергаться специфической модификации связанной с образованием O-связанного  $\beta$ -N-ацетилглюкозамина (O-GlcNAc). Авторы показали, что остаток S112 локализованный в внутри регуляторного SPR участка является единственным сайтом O-GlcNAc модификации белка SNAI1, которая приводит при гипергликемии к супрессии GSK-3 $\beta$ -зависимой деградации SNAI1 и усилению его репрессорной активности по отношению к промотору гена *CDH1* [53]. Интересно отметить, что схожий по структуре и функции SNAI1 белок SNAI2, как было показано, не подвергается подобной модификации [54].

Ближайшим родственным геном *SNAI1* в геноме человека является ген *SNAI2* возникший, по-видимому, в результате полногеномной дупликации у эволюционного предшественника позвоночных животных [55]. Принципиально модульная организация транс-

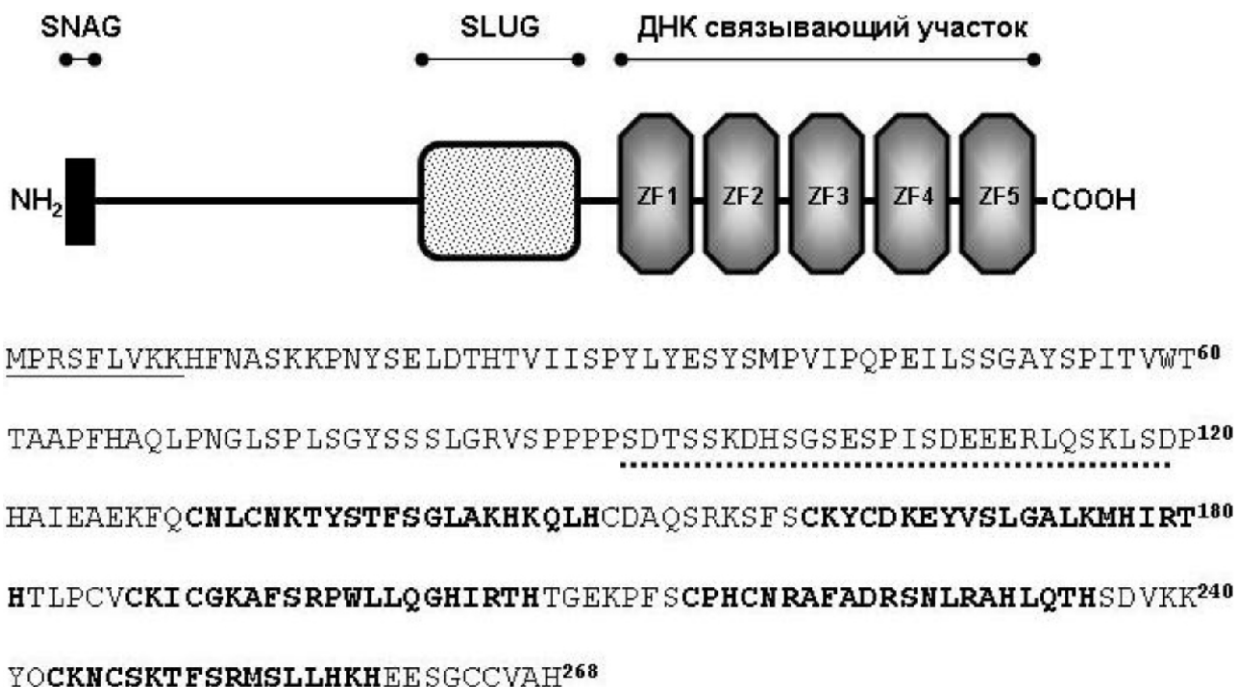


Рис. 2. Принципиальная модульная организация транскрипционного фактора SNAI2 и аминокислотная последовательность с указанием расположения функциональных участков. Жирным шрифтом указаны аминокислотные последовательности пяти C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> ZF-мотивов (ZF1-ZF5). Пунктирной линией подчеркнуты аминокислоты входящие в специфический для SNAI2 белка SLUG домен. Тонкой сплошной линией подчеркнута аминокислотная последовательность SNAG домена.

крипционного репрессора белка SNAI2(Slug) сходна со структурой белка SNAI1 [24] (рис. 2), однако эти белки могут регулировать активности различающихся наборов генов-мишеней в эпителиальных клетках [14]. Так же как и SNAI1, белок SNAI2 может быть условно разделен на две части — N-концевую регуляторную часть и C-концевую ДНК связывающую. На N-конце белка SNAI2 (1—9 аминокислота) находится консервативный репрессорный домен SNAG, отличающийся от гомологичной последовательности SNAI1 единственной аминокислотной заменой в положении 8 (RyK). Делеция этого небольшого участка в белке приводит к полной потере репрессорной активности SNAI2 по отношению к промотору гена E-кадгерина мыши [56]. Гомологичный белку SNAI1 ДНК связывающий участок SNAI2 расположен в C-концевой области (128—264 аминокислота) и состоит из пяти C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> ZF-мотивов (ZF1-ZF5). Первый ZF-мотив (ZF1) SNAI2 является, по-видимому, нефункциональным [57] и его инактивирующие мутации не приводят к снижению репрессорной активности SNAI2 по отношению к промоторам гена E-кадгерина человека (*CDH1*) и гена клаудин-1 (*CLDN1*) [58]. ДНК связывающая активность SNAI2 по отношению E-боксу элементу (E-pal) промотора гена E-кадгерина мыши существенно ниже связывающей активности белка SNAI1 [59], тем не менее, оверэкспрессия SNAI2 в эпителиальных клетках линии MDCK вызывает полный ЭМП сопровождающийся выраженной репрессией гена E-кадгерина [14]. Между SNAG доменом и ДНК связывающим доменом SNAI2 расположена протяженная аминокислотная последовательность, содержащая серин-пролин богатый SPR участок и специфический SLUG домен, отсутствующий у других представителей Snail суперсемейства. Предполагается, что этот SPR участок SNAI2 также содержит высокодегенерированные сайты так называемых CtBP-связывающих доменов (C-terminal binding protein interacting domains, CID домены), описанных впервые для белка Snail (dSnail) *Drosophila melanogaster* [27, 60, 61]. Для белка SNAI2 не описано NES-домена и домена дестабилизации (DB-домена), которые в родственном белке SNAI1 во многом определяют стабильность и внутриклеточную локализацию. По аналогии со SNAI1 было предположено присутствие диспергированного по ZF-участкам сигнала ядерной локализации SNAI2 [33].

Имеется относительно немного экспериментальных данных о посттрансляционных модификациях белка SNAI2 регулирующих его биологическую активность. Так, в *in vitro* экспериментах с очищенными фрагментами SNAI2 было показано, что большинство сайтов фосфорилирования белка SNAI2 ре-

комбинантной киназой GSK-3 $\beta$  находится в интервале между 63 и 130 аминокислотными остатками белка SNAI2 [62]. Использование мутантных рекомбинантных фрагментов SNAI2 содержащих замены остатков серина на аланин (S/A) показало, что сайтами для *in vitro* фосфорилирования белка киназой GSK-3 $\beta$  являются аминокислотные остатки S96, S100 и S104. В экспериментах по трансфекции ДНК конструкций с мутантным SNAI2 было показано также, что остатки S96, S100 и S104, по видимому, являются сайтами дестабилизирующего фосфорилирования так как их замена на соответствующие аланины приводила существенно к увеличению времени полужизни мутантного белка SNAI2 [62]. Авторы показали также, что, как и в случае с фосфорилированным GSK-3 $\beta$  белком SNAI1, фосфорилированный SNAI2 распознается  $\beta$ -Trcp1 E3 убиквитин лигазным комплексом и подвергается полиубиквитинированию с последующим протеасомным расщеплением [62]. В работе других авторов было показано, что фосфорилированный GSK-3 $\beta$  белок SNAI2 может распознаваться U-бокс E3 убиквитин лигазой CHIP (carboxyl terminus of Hcs70-interacting protein) с последующим полиубиквитинированием [63]. Помимо дестабилизирующего фосфорилирования в SPR участке белок SNAI2 может подвергаться фосфорилированию усиливающему его репрессорную активность. Так было показано, что замена остатка S4, локализованного в N-концевом SNAG домене, на остаток аспарагиновой кислоты, которая имитирует фосфорилирование серина, может приводить к существенному усилению репрессорной активности мутантного SNAI2 [56].

### Роль SNAI1 и SNAI2 в регуляции эпигенетических процессов, ведущих к ЭМП

Согласно современным представлениям о транскрипционной регуляции ЭМП репрессия генов определяющих эпителиальный фенотип клеток не заключается в простом репрессирующем эффекте связывания факторов типа SNAI1 и SNAI2 с соответствующими участками промоторной области регулируемого гена [17]. Вероятнее всего первоначальное связывание с E-бокс элементами инициирует образование на промоторах регулируемых генов макромолекулярных репрессорных комплексов обеспечивающих репрессивную эпигенетическую модификацию, как белков хроматина, так и ДНК. Белок-связывающие SNAG домены SNAI1 и SNAI2 взаимодействуют с различными ядерными факторами, которые в клетке обеспечивают регуляцию дифференциальной активности генома.

Ацетилирование остатков лизина в молекулах гистонов, таких, как H3K9 и H3K14, обычно ассоциировано с транскрипционной активностью гена и удаление этих активирующих модификаций (гистон деацетилирование) как правило, приводит к конденсации хроматина промоторной области гена и ослаблению транскрипции. Было показано, что связанный с промоторной областью мышинного гена *Cdh1* белок mSnail рекрутирует на промотор *Cdh1* репрессорный комплекс Sin3 содержащий гистон деацетилазу I класса HDAC1/2 и белок mSin3A [64]. Также белок SNAI1 рекрутирует на промоторы репрессируемых генов лизин-специфическую гистон деметилазу LSD1 (FAD-зависимая моноамин оксигеназа, KDM1A), которая является субъединицей другого репрессорного комплекса, включающего белки CoREST и HDAC 1/2 [65]. Аминоксидазный домен LSD1 связывается со SNAG доменом SNAI1, который имеет частичное сходство по аминокислотной последовательности с N-терминальным участком гистона H3 [66]. Образование комплекса SNAI1/CoREST/LSD1 на промоторных участках генов и в частности на промоторе гена *CDH1* приводит к деацетилированию гистонов H3K9/14ac и деметилированию активирующих транскрипцию модифицированных гистонов H3K4me3 и H3K4me2, что ведет к существенному ослаблению транскрипции. Однако важно отметить, что LSD1 также, кроме деметилирования H3K4me3, может частично деметилировать сильные репрессирующие модификации H3K9me3, превращая его в более слабые репрессирующие варианты, частично активирующие транскрипцию H3K9me2 и H3K9me1 [67]. Таким образом, формирование комплекса LSD1/SNAI1 на промоторах регулируемых SNAI1 генов может приводить как к репрессии регулируемого промотора, так и к его частичной активации, что позволяет LSD1 тонко регулировать активность генов мишеней транскрипционного фактора SNAI1. Помимо LSD1 деметилазы белок SNAI1 также связывается с ферментом LOXL2, который катализирует окислительное деаминирование определенных ε-аминогрупп лизина в ряде белков [49]. Недавно было показано, что связанный со SNAI1 фермент LOXL2 способен осуществлять деаминирование триметилированного гистона H3K4me3, тем самым удалять активирующие транскрипцию модификации гистона H3 [68].

Белки группы Поликомб (Polycomb group proteins, PcG) относятся к фундаментальным эпигенетическим регуляторам, которые контролируют такие процессы как раннее развитие, выбор направления дифференцировки и поддержание пула стволовых клеток взрослого организма [69]. Эти белки функционируют как транскрипционные репрессоры и входят в состав

двух макромолекулярных комплексов (PRC1 и PRC2). Показана тесная связь этих комплексов с транскрипционными факторами, регулирующими ЕМП третьего типа. Так, в раковых клетках поджелудочной железы и толстой кишки связанный с промоторной областью гена *CDH1* белок SNAI1 способен образовывать комплекс, по крайней мере, с двумя субъединицами PRC2 комплекса SUZ12 и EZH2, что приводит к репрессорному триметилированию лизинового остатка K27 гистона H3 (H3K27me3) прилежащего хроматина [70]. В сочетании с сохранением H3K4me3 формы гистона H3 это приводит к созданию квазистабильного локально бивалентного состояния хроматина, имеющего как репрессивные, так и активирующие гистоновые модификации. Бивалентное состояние хроматина характерно для промоторов ряда генов в эмбриональных клетках и практически отсутствует в нормальных дифференцированных тканях [71]. Предполагается, что подобное бивалентное состояние хроматина промотора гена *CDH1* и других важных для канцерогенеза генов может иметь место и в раковых стволовых клетках [17]. Формирование варианта H3K27me3, в свою очередь, создает возможности связывания с хроматином промоторной области гена хромодомен-содержащих субъединиц комплекса PRC1, таких, как CBX2, CBX4 и CBX8 [72]. Связывание комплекса PRC1 рекрутирует на промоторы белки SUV39H1 (гистон-лизин метилтрансфераза) и RING1 (PRC1 ассоциированную E3 убиквитин лигазу), что приводит к дальнейшему репрессированию транскрипционной активности гена за счет образования сильной репрессивной гистоновой модификации H3K9me3 и образованию моноубиквитинированного гистона H2AK119ub соответственно. Белок SNAI1 взаимодействует с SUV39H1 при TGF-β индуцированной репрессии гена *CDH1* в раковых клетках молочной железы, что свидетельствует о необходимости постоянного присутствия связанного с промотором SNAI1 для PRC1/PRC2 опосредованной репрессии *CDH1* [73]. Необходимо отметить, что SNAI1 способен формировать активный комплекс с другой гистон-лизин метилтрансферазой G9a [74]. Эухроматин-ассоциированная метилтрансфераза G9a метилирует и диметилирует гистон H3, что приводит к образованию репрессорных модификаций H3K9me и H3K9me2, которые, в свою очередь, являются субстратами для белка SUV39H1 [75]. Рекрутированная SNAI1 метилтрансфераза G9a формирует H3K9me2-обогащенный хроматин промоторного участка, который затем дополнительно эпигенетически репрессируется за счет метилирования ДНК [74]. Таким образом, ЕМП фактор SNAI1 является частью многокомпонентной эпигенетической молекулярной машины осуществляющей реPRESSION генов



эпителиальной дифференцировки, которая критически важна для нормального развития и при патологических процессах вовлечена в формирование инвазивного фенотипа опухолевых клеток [76].

Помимо формирования репрессивного состояния хроматина за счет модификации нуклеосомальных гистонов стабильная инактивация генов эпителиальной дифференцировки в раковых клетках, в частности, гена *CDH1*, обычно сопровождается метилированием С-5 положения цитозина в CpG динуклеотидах, расположенных внутри и вблизи промоторных участков репрессируемых генов [76]. Метилирование цитозина в CpG приводит к формированию закрытой формы хроматина и наследуемой в ходе клеточных делений транскрипционной репрессии гена *CDH1* [76, 77]. Минимальный промотор гена *CDH1* человека содержит 29 CpG динуклеотидов 98% цитозинов, которых могут быть метилированы в некоторых клеточных линиях [78]. Основным ферментом, обеспечивающим CpG метилирование в соматических клетках человека является ДНК метилтрансфераза DNMT1 [79]. Белок SNAI1 способен образовывать комплексы с DNMT1 путем прямого взаимодействия либо за счет других ассоциированных с ним белков [77, 74]. Так, было показано, что в клетках карциномы толстой кишки HCT116 белок SNAI1 способен образовывать ядерный комплекс с DNMT1. Взаимодействие осуществляется через N-концевой SNAG домен SNAI1 и N-концевую часть DNMT1, содержащую DMAP-1 и PCNA- связывающие домены. Способность DNMT1 образовывать комплекс с SNAI1 не зависела от каталитического домена ДНК метилтрансферазы [77]. Интересно, что экспрессия белка DNMT1 с гипоморфного аллеля *DNMT1<sup>delE3-6</sup>* приводила в клетках HCT116 к выраженному ЕМП и неспособностью N-делетированного DNMT1 связываться SNAI1. В работе Dong et al [74] было обнаружено образование устойчивого тройного комплекса SNAI1/G9a/DNMT1 в клетках рака молочной железы, причем авторы показали, что белок G9a выполняет роль своеобразного «мостика» соединяющего белки SNAI1 и DNMT1. Ингибирование G9a приводило к разрушению комплекса SNAI1/G9a/DNMT1 и индуцированному деметилированию промоторной области гена E-кадгерина [74].

### Заключение

В настоящее время факторы семейства Snail рассматривают как принципиальные транскрипционные репрессоры генов, определяющих эпителиальный фенотип клеток. Кроме *CDH1*, к эпителиальным генам, которые репрессируются SNAI1 и SNAI2 относятся

гены нескольких цитокератинов CK8, CK17/18 [12] и CK19, ген *Crumbs3* [80], окклюдин, клаудины 1, 3, 4 [81] и 7 [82], муцин *MUC1* [83] и гены *HNF4α* и *HNF1β* [84]. SNAI1 и SNAI2 опосредованная репрессия этих генов осуществляется через прямое связывание белкового репрессора с E-бокс последовательностями ДНК внутри промоторной области регулируемых генов. Как осуществляется процесс многостадийной репрессии активности этих генов и насколько он схож с инактивацией промотора *CDH1* гена в настоящее время известно очень мало. Необходимо также отметить, что помимо репрессии активности эпителиальных генов в ходе ЭМП также происходит активация экспрессии многих генов мезенхимальной дифференцировки, среди которых виментин, различные коллагены, фибронектин, *LEF1* и *ZEB1* [83]. Участие белков SNAI1 и SNAI2 в активации транскрипции генов, по-видимому, опосредованное [83] поскольку к текущему моменту немного данных о генах, чьи промоторные области активируются напрямую этими транскрипционными факторами [85, 86]. Дальнейший полногеномный анализ взаимодействий SNAI1 и SNAI2 и их функциональных комплексов с цис-регуляторными участками генома, а также изменений профилей этих взаимодействий при канцерогенезе и, в особенности, при метастазировании поможет лучше понять механизмы ЭМП и возможно откроет новые более эффективные варианты активного воздействия на этот важнейший биологический феномен в медицинских целях.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-50-00131).*

### References

1. Hay E.D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat.* 1995; 154(1):8-20.
2. Kalluri R., Weinberg R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009; 119(6):1420-8.
3. Nieto M.A. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011; 27:347-76.
4. Thiery J.P., Sleeman J.P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7(2):131-42.
5. Hay E.D. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn.* 2005; 233(3):706-20.
6. Gittes G.K. Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. *Dev Biol.* 2009; 326(1):4-35.
7. Nakaya Y., Sheng G. EMT in developing morphogenesis. *Cancer Lett.* 2013; 341(1):9-15.
8. Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y., Nieto M.A. Epithelial-mesenchymal transition in development and disease. *Cell.* 2009; 139(5):871-90.



9. Kim K.K., Kugler M.C., Wolters P.J., Robillard L., Galvez M.G., Brumwell A.N. et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103(35):13180-5.
10. Zeisberg M., Yang C., Martino M., Duncan M.B., Rieder F., Tanjore H., Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem*. 2007; 282(32):23337-47.
11. Kalluri R., Nielson E.G. Epithelial-mesenchymal transition and its implication for fibrosis. *J Clin Invest*. 2003; 112(12):1776-84.
12. De Craene B., Gilbert B., Stove C., Bruyneel E., van Roy F., Berx G. The transcription factor Snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res*. 2005; 65(14):6237-6244.
13. Bermejo-Rodriguez C., Perez-Caro M., Perez-Manquera P.A., Sanchez-Beato M., Piris M.A., Sanchez-Garcia I. Mouse cDNA microarray analysis uncovers Slug targets in mouse embryonic fibroblasts. *Genomics*. 2006; 87(1):113-8.
14. Moreno-Bueno G., Cubillo E., Sarrio D., Peinado H., Rodriguez-Pinilla S.M., Villa S. et al. Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2006; 66(19):9543-56.
15. Hussey G.S., Link L.A., Brown A.S., Howley B.V., Chaudhury A., Howe P.H. Establishment of a TGF $\beta$ -induced post-transcriptional EMT gene signature. *PLoS One*. 2012; 7(12):e52624.
16. Malouf G.G., Taube J.H., Lu Y., Roysarkar T., Panjarian S., Estecio M.R. et al. Architecture of epigenetic reprogramming following Twist1-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Genome Biol*. 2013; 14(12):R144.
17. Tam W.L., Weinberg R.A. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med*. 2013; 19(11):1438-49.
18. Birchmeier W., Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1198(1):11-26.
19. Thiery J.P. Epithelial-mesenchymal transition in tumor progression. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(6):442-54.
20. Nelson W.J., Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 2004; 303(5663):1483-7.
21. Peinado H., Portillo F., Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol*. 2004; 48(5-6):365-75.
22. Peinado H., Olmeda D., Cano A. Snail, ZEB and bHLH factors in tumor progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(6):415-28.
23. De Craene B., Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13(2):97-110.
24. Manzanares M., Locascio A., Nieto M.A. The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution. *Trends Genet*. 2001; 17(4):178-81.
25. Grau Y., Carteret C., Simpson P. Mutations and chromosomal rearrangements affecting the expression of snail, a gene involved in embryonic patterning in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1984; 108(2):347-60.
26. Alberga A., Boulay J.L., Kempe E., Dennefeld C., Haenlin M. The snail gene required for mesoderm formation in *Drosophila* is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers. *Development*. 1991; 111(4):983-92.
27. Nieto M.A. The Snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3(3):155-66.
28. Pabo C., Peisach E., Grant R.A. Design and selection of novel Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> zinc finger proteins. *Annu Rev Biochem*. 2001; 70:313-40.
29. Grimes H.L., Chan T.O., Zweidler-McKay P.A., Tong B., Tschlis P.N. The Gfi-1 proto-oncogene contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol Cell Biol*. 1996; 16(11):6263-72.
30. Dominguez D., Montserrat-Sentis B., Virgos-Soler A., Guaita S., Grueso J., Porta M. et al. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(14):5078-89.
31. Zhou B.P., Deng J., Xia W., Xu J., Li Y.M., Gunduz M., Hung M.C. Dual regulation of Snail by GSK-3 $\beta$ -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*. 2004; 6(10):931-40.
32. Ko H., Kim H.S., Kim N.H., Lee S.H., Kim K.H., Hong S.H., Yook J.I. Nuclear localization signals of the E-cadherin transcriptional repressor Snail. *Cells Tissues Organs*. 2007; 185(1-3):62-7.
33. Mingot J-M., Vega S., Maestro B., Sanz J.M., Nieto M.A. Characterization of Snail nuclear import pathways as representatives of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger transcription factors. *J Cell Sci*. 2009; 122(9):1452-60.
34. Yamasaki H., Sekimoto T., Ohkudo T., Douchi T., Nagata Y., Ozawa M., Yoneda Y. Zinc finger domain of Snail function as a nuclear localization signal for importin beta-mediated nuclear import pathway. *Genes Cells*. 2005; 10(5):455-64.
35. MacPherson M.R., Molina P., Souchelnytskyi S., Wernstedt C., Martin-Perez J., Portillo F., Cano A. Phosphorylation of serine 11 and serine 92 as new positive regulator of human Snail1 function: potential involvement of casein kinase-2 and the cAMP-activated kinase protein kinase A. *Mol Biol Cell*. 2010; 21(2):244-53.
36. Yang Z., Rayala S., Nguyen D., Vadlamudi R.K., Chen S., Kumar R. Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions. *Cancer Res*. 2005; 65(8):3179-84.
37. Yook J.I., Li X.Y., Ota I., Fearon E.R., Weiss S.J. Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J Biol Chem*. 2005; 280(12):11740-8.
38. Liu C., Li Y., Semenov M., Han C., Baeg G.H., Tan Y. et al. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by dual-kinase mechanism. *Cell*. 2002; 108(6):837-847.
39. Xu H., Lee S-H., Kim H.S., Kim N.H., Piao S., Park S.-H. et al. Role of CK1 in GSK3 $\beta$ -mediated phosphorylation and degradation of Snail. *Oncogene*. 2010; 29(21):3124-33.
40. Yook J.I., Li X.Y., Ota I., Hu C., Kim H.S., Kim N.H. et al. A Wnt-Axin2-GSK3 $\beta$  cascade regulates Snail activity in breast cancer cells. *Nat Cell Biol*. 2006; 8(12):1398-06.
41. Kishida M., Hino S., Michiue T., Yamamoto H., Kishida S., Fukui A. et al. Synergistic activation of the Wnt signaling pathway by Dvl and casein kinase I $\epsilon$ . *J Biol Chem*. 2001; 276(35):33147-55.

42. Bachelder R.E., Yoon S.-O., Franci C., Garcia de Herreros A., Mercurio A.M. Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implication for the epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 2005; 166(1):29-33.
43. Wu Y., Evers B.M., Zhou B.P. Small C-terminal domain phosphatase enhance Snail activity through dephosphorylation. *J Biol Chem.* 2009; 284(1):640-8.
44. Salh B., Marotta A., Wagey R., Sayed M., Pelech S. Dysregulation of phosphatidylinositol 3-kinase and downstream effectors in human breast cancer. *Int J Cancer.* 2000; 98(1):148-54.
45. Zhang K., Rodriguez-Aznar E., Yabuta N., Owen R.J., Mingot J.M., Nojima H. et al. Lats2 kinase potentiates Snail1 activity by promoting nuclear retention upon phosphorylation. *EMBO J.* 2012; 31(1):29-43.
46. Zeng Q, Hong W. The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals. *Cancer Cell.* 2008; 13(3):188-192.
47. Varelas X., Samavarchi-Tehrani P., Narimatsu M., Weiss A., Cockburn K., Larsen B.G. et al. The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF-beta-SMAD pathway. *Dev Cell.* 2010; 19(6):831-84.
48. Peinado H., Portillo F., Cano A. Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3 $\beta$ . *Cell Cycle.* 2005; 4(12):1479-82.
49. Peinado H., Iglesias-de la Cruz M.C., Olmeda D., Csiszar K., Fong K.S., Vega S. et al. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J.* 2005 24(19):3446-58.
50. Barker H.E., Cox T.R., Emler J.T. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012; 12(8):540-52.
51. Vinas-Castells R., Beltran M., Valls G., Gymez I., Garcia J.M., Montserrat-Senths B. et al. The hypoxia-controlled FBXL14 ubiquitin ligase targets SNAIL1 for proteasome degradation. *J Biol Chem.* 2010; 285(6):3794-805.
52. Rodriguez M.I., Gonzalez-Flores A., Dantzer F., Collard J., Garcia de Herreros A., Oliver F.J. Poly (ADP-ribose)-dependent regulation of Snail1 protein stability. *Oncogene.* 2011; 30(42):4365-72.
53. Park S.Y., Kim H.S., Kim N.H., Ji S., Cha S.Y., Kang J.G. et al. Snail is stabilized by O-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. *EMBO J.* 2010; 29(22):3787-96.
54. Kim J.Y., Kim Y.M., Yang C.H., Cho S.K., Lee J.W., Cho M. Functional regulation of Slug/Snail2 is dependent on GSK-3 $\beta$ -mediated phosphorylation. *FEBS Journal.* 2012; 279(16):2929-39.
55. Holland P.W.H., Garcia-Fernandez J., Williams N.A., Sidow A. Gene duplication at the origin of vertebrate development. *Development.* (Suppl). 1994; 120:125-33.
56. Molina-Ortiz P., Villarejo A., MacPherson M., Santos V., Montes A., Souchelnyskiy S. et al. Characterization of the SNAG and SLUG domains of Snail2 in the repression of E-cadherin and EMT induction: modulation by serine 4 phosphorylation. *PLoS One.* 2012; 7(5):e36132.
57. Pavletich N.P., Pabo C.O. Crystal structure of a five finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science.* 1993; 261(5129):1701-7.
58. Villarejo A., Cortes-Cabrera A., Molina-Ortiz P., Portillo F., Cano A. Differential role of Snail1 and Snail2 zinc fingers in E-cadherin repression and epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 2014; 289(2):930-41.
59. Bolos V., Peinado H., Perez-Moreno M.A., Fra-gua M.F, Esteller M., Cano A. The transcriptional factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci.* 2003; 116(3):499-511.
60. Hemavathy K., Guru S.C., Harris J., Cheng J.D., Ip Y.T. Human Slug is a repressor that localizes to sites of active transcription. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(14):5087-95.
61. Coboleda C., Perez-Caro M., Vicente-Duenas C., Sanchez-Garcia I. Function of the zinc-finger transcription factor SNAIL2 in cancer and development. *Annu Rev Genet.* 2007; 41:41-61.
62. Wu Z-Q., Li X-Y., Hu C.Y., Ford M., Kleer C.G., Weiss S.J. Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(41):16654-9.
63. Kao S.H., Wang W.L., Chen C.Y., Chang Y.L., Wu Y.Y., Wang Y.T. et al. GSK3 $\beta$  controls epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis by CHIP-mediated degradation of Slug. *Oncogene.* 2013; doi:10.1038/onc.2013.279 [Epub ahead of print].
64. Peinado H., Ballestar E., Esteller M., Cano A. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/Histone deacetylase 1(HDAC1)/ HDAC2 complex. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(1):306-19.
65. Lin T., Ponn A., Hu X., Law B.K., Lu J. Requirement of the histone demethylase LSD1 in Snail1-mediated transcriptional repression during epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene.* 2010; 29(35):4896-904.
66. Lin Y., Wu Y., Li J., Dong C., Ye X., Chi Y.I. et al. The SNAG domain of Snail1 functions as a molecular hook for recruiting lysine-specific demethylase 1. *EMBO J.* 2010; 29(11):1803-16.
67. Metzger E., Wissmann M., Yin N., Muller J.M., Schneider R., Peters A.H. et al. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature.* 2005; 437(7057):436-9.
68. Herranz N., Dave N., Millanes-Romero A., Morrey L., Diaz V.M., Lorenz-Fonfria V. et al. Lysyl oxidase-like 2 deaminates lysine 4 in histone H3. *Molecular Cell.* 2012; 46(3):369-76.
69. Sparmann A., van Lohuisen M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(11):846-56.
70. Herranz N., Pasini D., Diaz V.M., Franci C., Gutierrez A., Dave N. et al. Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor. *Mol Cell Biol.* 2008; 28(15):4772-81.
71. Voigt P., Tee W.W., Reinberg D. A double take on bivalent promoters. *Genes Dev.* 2013; 27(12):1318-38.
72. Mills A.A. Throwing the cancer switch: reciprocal roles of polycomb and trithorax proteins. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(10):669-82.
73. Dong C., Wu Y., Wang Y., Wang C., Kang T., Rychahou P.G. et al. Interaction with Suv39H1 is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in breast cancer. *Oncogene.* 2013; 32(11):1351-62.
74. Dong C., Wu Y., Yao J., Wang Y., Yu Y., Rychahou P.G. et al. G9a interact with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer. *J Clin Invest.* 2012; 122(4):1469-86.

75. Collins R., Cheng X. A case study in cross-talk: the histone lysine methyltransferases G9a and GLP. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38(11):3503-11.
76. Baylin S.B., Jones P.A. A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11(10):726-34.
77. Espada J., Peinado H., Lopez-Serra L., Setien F., Lopez-Serra P., Portela A. et al. Regulation of SNAIL1 and E-cadherin function by DNMT1 in a DNA methylation-independent context. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(21):9194-205.
78. Reinhold W.C., Reimers M.A., Lorenzi P., Ho J., Shankavaram U.T., Ziegler M.S. et al. Multifactorial regulation of E-cadherin expression: an integrative study. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9(1):1-16.
79. Chen T., Li E. Structure and functions of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr Top Dev Biol.* 2004; 60(1):55-89.
80. Whiteman E.L., Liu C.J., Fearon E.R., Margolis B. The transcriptional factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes. *Oncogene.* 2008; 27(27):3875-89.
81. Ikenouchi J., Matsuda M., Furuse M., Tsukita S. Regulation of tight junctions during the epithelium — mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 10):1959-67.
82. Martinez-Estrada O.M., Culleres A., Soriano F.X., Peinado H., Bolos V., Martinez F.O. et al. The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem.J.* 2006; 394(2):449-57.
83. Guaita S., Puig I., Fanci C., Garrido M., Dominguez D., Batlle E. et al. Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem.* 2002; 277(42):39209-16.
84. Cicchini C., Filippini D., Coen S., Marchetti A., Cavallari C., Laudadio I. et al. Snail controls differentiation of hepatocytes by repressing HNF4 $\alpha$  expression. *J Cell Physiol.* 2006; 209(1):230-8.
85. Jorda M., Olmeda D., Vinyals A., Valero E., Cubillo E., Llorens A. et al. Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J Cell Sci.* 2005; 118(Pt 15):3371-85.
86. Hu C-T., Chang T-Y., Cheng C-C., Liu C-S., Wu J-R., Li M-C, Wu W-S. Snail associates with EGR-1 and SP-1 to upregulate transcriptional activation of p15<sup>INK4B</sup>. *FEBS Journal.* 2010; 277(5):1202-18.

Received 01.04.15

#### Сведения об авторах:

Усова Евгения Витальевна, мл. науч. сотр. лаб. молекулярной медицины, ФГБУ «Институт хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России, e-mail: eugenia125@mail.ru

Копанцева Марина Робертовна, к.биол.н., ст. науч. сотр. лаб. молекулярной медицины, ФГБУ «Институт хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России, e-mail: Korantseva@ixv.ru

Егоров Вячеслав Иванович, д.м.н., гл. онколог, Городская клиническая больница №5 Департамента здравоохранения г.Москвы (ГБУЗ «ГКБ №5 ДЗМ»), e-mail: egorov12333@gmail.com

Свердлов Евгений Давидович, акад. РАН, зав. лаб. структуры и функции генов человека, ФГБУН ИБХ РАН, e-mail: edsverd@gmail.com

Зорин В.Л.<sup>1,2</sup>, Зорина А.И.<sup>2</sup>, Пулин А.А.<sup>1</sup>, Копнин П.Б.<sup>3</sup>, Еремин И.И.<sup>1</sup>

## **Перспективы использования клеток, обладающих миогенным потенциалом, в лечении заболеваний скелетных мышц: обзор исследований. Ч. 1. Сателлитные клетки**

<sup>1</sup> — ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 123182, Москва, ул. Живописная, 46

<sup>2</sup> — ОАО Институт стволовых клеток человека, 119333, Москва, ул. Губкина, 3, стр. 2

<sup>3</sup> — НИИ Канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 115478, Москва, Каширское ш., 24

*Нарушения функций скелетно-мышечного аппарата могут развиваться вследствие как травм, так и различного рода врожденных / приобретенных заболеваний, среди которых особое место занимают мышечные дистрофии. Одним из наиболее перспективных подходов к решению проблемы эффективного восстановления структуры и функций скелетных мышц считают технологии с использованием клеток, обладающих миогенным потенциалом. В I части статьи рассмотрены характерные свойства, функции и фенотипические особенности сателлитных клеток (СК) как ключевого фактора регенерации скелетной мышечной ткани. Дан анализ представленных в литературе результатов научных исследований (доклинических и клинических) терапевтических возможностей технологий с применением СК. Во второй части обзора будут представлены данные литературы по возможностям терапевтического использования стволовых клеток мышечного и немышечного происхождения для лечения заболеваний скелетных мышц.*

**Ключевые слова:** *стволовые клетки, клетки с миогенным потенциалом, сателлитные клетки, миосателлитозиты, скелетная мышца, мышечные дистрофии, регенерация, клеточная терапия*

Zorin V.L.<sup>1,2</sup>, Zorina A.I.<sup>2</sup>, Pulin A.A.<sup>1</sup>, Kopnin P.B.<sup>3</sup>, Eremin I.I.<sup>1</sup>

## **Prospects for the use of cells possessing myogenic potential in the treatment of skeletal muscle diseases: a review of research. Part 1 — satellite cells**

<sup>1</sup> — A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center FMBA of Russia, 46 Zhivopisnaya Str., Moscow, 123182, Russia

<sup>2</sup> — Human Stem Cells Institute, 3/2 Gubkina Str., Moscow, 119333, Russia

<sup>3</sup> — N.N. Blokhin Cancer Research Center of RAMS, 24, Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

*Musculoskeletal functions disorders may develop as a consequence of injuries and various types of congenital / acquired diseases, among which a special place belongs to muscular dystrophy. The technology with use of cells possessing myogenic potential is considered as one of the most promising approaches to solve the problem of effective restoration of skeletal muscles structure and function. In part I of the article the characteristic features, functions and phenotypic characteristics of satellite cells (SC) are reviewed as key factors of skeletal muscle tissue regeneration. Presented analysis of research results (preclinical and clinical) concerning therapeutic possibilities of technology using SC. In the second part of review will be presented data of the therapeutic use of stem cells of muscle and non-muscle origin for the treatment of skeletal muscles diseases.*

**Key words:** *stem cells, cells with myogenic potential, satellite cells, myosatellite cell, skeletal muscle, muscular dystrophy, regeneration, cell therapy*

Скелетная мышечная ткань играет важнейшую роль в поддержании гомеостаза жизнедеятельности организма [1]. Поддержание скелетной мускулатуры в нормальном функциональном состоянии — обязательное условие обеспечения полноценного качества жизни человека.

К серьезным дисфункциям скелетной мускулатуры относятся мышечные дистрофии (дефект самой мышцы), нейромышечные заболевания (нарушения нейронального контроля мышцы), саркопения (атрофическое дегенеративное изменение скелетной мускулатуры, ассоциированное с возрастом), кахексия (потеря мышечной ткани, индуцированная онкологическим заболеванием) и другие врожденные и приобретенные миопатии, причем ряд из этих патологий, в частности мышечные дистрофии, неизлечимы и завершаются летальным исходом [1, 2].

**Для корреспонденции:** *Еремин Илья Игоревич, к.м.н., руководитель Центра биомедицинских технологий ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, e-mail: cd105@mail.ru*



Среди миопатий наиболее хорошо изучены мышечные дистрофии, которые представляют собой группу генетических заболеваний, характеризующихся прогрессирующей мышечной слабостью и заканчивающихся атрофией мышц [3—6]. Сегодня известно примерно 40 типов мышечных дистрофий, различающихся по степени тяжести. В дистрофической мышце происходит уменьшение в размерах мышечных волокон, их повреждение и гибель, сопровождающиеся некрозом, и замещение мышечной ткани соединительной и жировой [7]. Причина, лежащая в основе большинства мышечных дистрофий, — мутации в генах, кодирующих компоненты дистрофин-гликопротеинового комплекса, который связывает миофибрильный цитоскелет клетки с ее межклеточным матриксом (МКМ) [8—10] и отвечает за целостность и функции мышечной клетки [11]. К наиболее распространенным и тяжелым из них относится X-сцепленная рецессивная мышечная дистрофия Дюшена — врожденное заболевание, частота встречаемости которого составляет 1:3500 новорожденных мальчиков [12, 13].

В настоящее время поиски путей восстановления нормальной структуры и функций скелетных мышц идут по разным направлениям: с помощью фармакологических препаратов (противовоспалительных и воздействующих на вторичных посредников передачи сигнала) [14, 15], клеточной терапии [14], генной инженерии — методом «перепрыгивания экзонов» (exon-skipping capacity) [14, 16, 17] или редактирования генома посредством лентивирусов и системы CRISPR/Cas9 [18].

Как одно из наиболее перспективных направлений рассматривается применение клеточных технологий, базирующихся на трансплантации внутримышечно или в системный кровоток клеток с миогенным потенциалом, то есть способных дифференцироваться в миотубы (мышечные трубки) [14, 19]. Предполагается, что интеграция клеток с нормальным генотипом с патологически измененными резидентными стволовыми клетками приведет к реализации метаболизма поврежденных мышечных волокон и восстановлению в дальнейшем физиологического гомеостаза скелетной мышцы. Немаловажную роль в этих процессах играет также противовоспалительный и иммуномодулирующий эффекты клеточной терапии, поскольку воспаление является значимым звеном патогенеза патологии скелетных мышц [20, 21].

*Цель обзора — анализ научно доказанных характерных свойств, функций и фенотипических особенностей клеток с миогенным потенциалом, а также возможностей их применения для восстановления структуры и функций скелетных мышц.*

## Структура и регенераторный потенциал скелетных мышц

Скелетная мышечная ткань представляет собой сложную систему, состоящую из многоядерных клеток — мышечных волокон, или симпластов, являющихся ее структурно-функциональными единицами. Симпласты развиваются из многоядерных миотуб (мышечных трубок).

Каждое мышечное волокно окружено сарколеммой, тонкой оболочкой, состоящей из внутренней части — плазмолеммы и наружной — базальной мембраны. Мышечные волокна сгруппированы в пучки, формирующие скелетную мышцу [22].

Скелетные мышцы отличаются высоким регенераторным потенциалом, который, как и у большинства постнатальных тканей, поддерживается пулом тканеспецифичных, так называемых взрослых стволовых клеток [19, 20, 23, 24]. Основной клеточной популяцией, ответственной за регенерацию и рост скелетных мышц, являются сателлитные клетки (СК). Их роль хорошо видна на примере X-сцепленной рецессивной мышечной дистрофии Дюшена (DMD). Развитие этого заболевания обусловлено отсутствием функционального белка дистрофина вследствие мутации в гене *DMD* [19]. Утрата дистрофина ослабляет структурную целостность сарколеммы, что приводит к прогрессирующему повреждению мышц [25]. Последнее, в свою очередь, индуцирует хронические циклы дегенерации и регенерации мышечных волокон, что побуждает СК претерпевать непрерывные циклы активации, пролиферации и дифференцировки [1, 23, 24]. Так, в экспериментах показано, что СК mdx-мышей (дистрофин-дефицитных мышей, используемых в качестве модели DMD у человека) постепенно утрачивают свои регенеративные свойства [26]. Вероятно, истощение пула СК делает мышечную ткань неспособной к восстановлению после повреждений, вследствие чего постепенно происходит ее замена соединительной и жировой тканью [20].

Таким образом, именно популяция стволовых СК обеспечивает процессы роста, дифференцировки и восстановления скелетных мышц в норме и при патологии в постнатальный период [20, 27—32].

Однако в исследованиях последних лет идентифицированы также и популяции других стволовых клеток, способных участвовать в миогенезе и восстановлении физиологического гомеостаза скелетных мышц [1, 14, 20]. Их можно разделить на 2 группы:

- 1) клетки мышечного происхождения, содержащиеся в самих скелетных мышцах: мультипотентные клетки-предшественники (MDSCs), мышечные стволовые клетки побочной популяции (SMSP) и мультипотентные клетки-предшественники CD133+;

2) клетки немышечного происхождения: мультипотентные мезенхимные стволовые клетки, выделенные из костного мозга (ММСК<sub>км</sub>); мультипотентные клетки-предшественники CD133+, выделенные из мобилизованной крови; мультипотентные прогениторные клетки; мезоангиобласты; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs) (рис. 1).

### Сателлитные клетки — идентификация и роль в миогенезе

Сателлитные клетки — небольшие стволовые/прогениторные клетки, локализованные в мышечном волокне [2, 33, 34]. Показано, что СК мигрируют из дорсальных компартментов сомита в период эмбриогенеза и функционируют на протяжении всего онтогенеза [27, 35]. В постнатальный период процессы обновления и регенерации скелетной мышечной ткани происходят за счет дифференцировки СК [28—29]. Эти клетки обладают также способностью к самообновлению, благодаря чему поддерживается пул резидентных недифференцированных СК мышечной ткани [30, 31].

Взрослые СК (согласно современной гистологической номенклатуре — миосателлитоциты [36]) впервые были описаны А. Маго в 1961 г. как одноядерные клетки, локализованные между плазмолеммой мышечного волокна и базальной мембраной [33], что играет определяющую роль в поддержании их пролиферативного покоя [36]. Идентифицируют СК не только по их локализации, но и по экспрессии определенных белков — специфических маркеров (таблица). Некоторые из них являются внутриклеточными, как например: транскрипционный фактор парного гомеобокса PAX7 и белки ядерной мембраны ламин А/С (LMNA) и эмерин (EMD). Другие маркеры: синдеканы 3 и 4 (SDC3 и SDC4), мышечный М-кадгерин (M-cadherin), рецептор кальцитонина (CALCR), хемокиновый CXС-рецептор 4-го типа (CXCR4), caveолин 1 (CAV1),  $\alpha 7$ - и  $\beta 1$ -интегрины, NCAM1 (neural cell adhesion molecule 1 — нейрональная молекула клеточной адгезии 1), VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1 — васкулярная молекула клеточной адгезии 1) и CD34 (маркер гемопоэтических и эндотелиальных стволовых клеток) — локализуются на поверхности клеточной мембраны [37, 38].

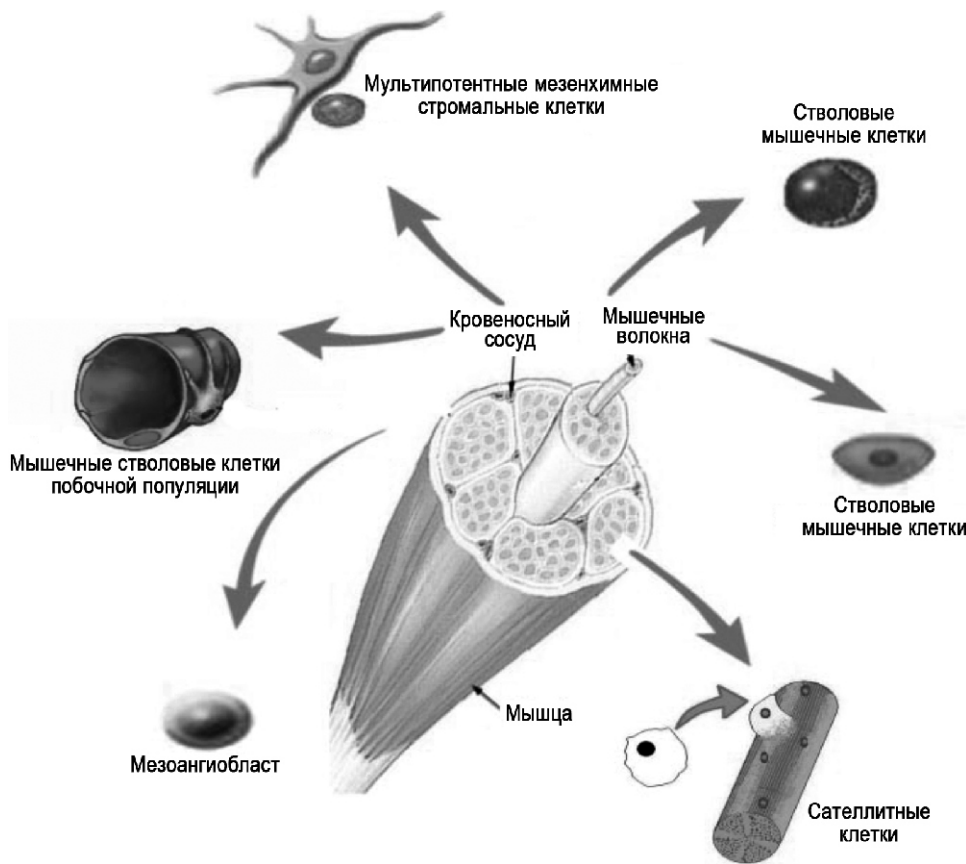


Рис. 1. Источники получения стволовых клеток, обладающих миогенным потенциалом (A.Farini с соавторами, 2009 [14], рисунок модифицирован авторами настоящей статьи).

Маркеры сателлитных клеток (S. Kuang and M. Rudnicki, 2007) [50]

Маркер	Экспрессия Вид	СК в покое	Активированные СК	Дифференцированные миобласты	Функции
Клеточная поверхность					
c-met	м, ч	+	+	+	HGF-рецептор
Caveolin-1	м	+			Остановка клеточного цикла
CD34	м	+	+	+	Неизвестно (включается во время активации)
CTR	м	+			Регуляция состояния покоя
CXCR4/SDF-1b	м, ч	+	+	+	Миграция
ErbB receptor	м		+	+	Антиапоптоз
Igsf4a	м	+	+		Неизвестно
Integrin a7	м, ч	+	+	+	Передача сигналов в МКМ, слияние
Integrin b1	м, ч	+	+	+	Передача сигналов в МКМ, слияние
M-cadherin	м, ч	+	+	+	Анкеровка
Necdin	м		+	+	Активирует дифференцировку
Megf10	м	+/	+		Регулятор состояния покоя
NCAM	м, ч	+	+	+	Адгезия
Neuritin-1	м	+	+		Неизвестно
p75NTR/BDNFC	м	+	+		Ингибция дифференцировки
Pb99	м	+	+		Неизвестно
SM/C-2.6	м	+	+		Неизвестно
Sphingomyelin	м	+			Активация клеточного цикла
Syndecan 3/4	м	+	+	+	Передача сигналов в МКМ
TcRb	м	+	+		Неизвестно
VCAM-1/VLA-4d	м	+	+	+	Слияние миобластов
Транскрипционные факторы					
Foxk1	м	+	+	+	Пролиферация или клеточный цикл
HoxC10	м	+	+	+	Неизвестно
Lbx1	м		+	+	Принудительный перевод активированных СК в состояние покоя
Myf5	м, ч	+	+	+	Миогенное программирование и транзитная амплификация
MyoD	м, ч		+	+	Активация и миогенная дифференцировка
Msx1	м	+			Ингибция дифференцировки
Pax3	м	+/	+/		Множество функций
Pax7	м, ч	+	+		Множество функций
Sox8/9 Другие	м	+	+		Ингибция дифференцировки
Desmin	м, ч	+/	+	+	Цитоскелет
Myostatin/ACVR2	м, ч	+	+	+	Ингибция активации СК и мышечного роста
Nestin	м, ч	+			Цитоскелет, ядерная организация?

Примечание. МКМ — межклеточный матрикс; м — мышь, ч — человек.

В постнатальном периоде все покоящиеся СК экспрессируют такие транскрипционные факторы и маркеры, как Pax7, CD34, c-met, Foxk1, M-cadherin [39, 40]. Некоторые субпопуляции СК ряда скелетных мышц (в частности, диафрагмы и мышц стенок тела) экспрессируют также и транскрипционный фактор Pax3 — паралог Pax7 [41, 42]. Известно, что Pax3 играет ключевую роль в период эмбрионального миогенеза и в большинстве СК его экспрессия подавляется перед рождением [43]. А в постнатальном периоде ключевым для СК становится транскрипционный фактор Pax7 [44]. Так, показано, что у линии мышей, у которых отсутствует ген Pax7 (Pax7-null mice), нет и СК [39, 44]. Проведенный сравнительный анализ участков связывания транскрипционных факторов Pax3 и Pax7 по всему геному подтвердил, что Pax7 играет доминирующую роль в регуляции транскрипции генома взрослых СК скелетных мышц [43]. Таким образом, транскрипционные факторы семейства Pax — Pax3 и Pax7 — играют основные и не дублирующие друг друга роли в миогенезе скелетных мышц [45].

В физиологических условиях стволовые СК находятся в состоянии покоя, пассивно располагаясь в своей анатомической нише (в специфическом микроокружении, состоящем из сети фибриллярных белков, ростовых факторов / цито- и хемокинов, а также молекул, продуцируемых соседними клетками [20, 44]). Состояние покоя СК обеспечивается сочетанием двух факторов — подавлением транскрипции ключевых генов и высокой экспрессией белков-ингибиторов клеточного цикла [40]. Основную роль в подавлении клеточного цикла играет сигнальный путь Notch, активация которого лигандами Delta и/или Jagged запускает экспрессию генов-мишеней Notch — Hes1, Hes5, Hey и Heyl [47, 48]. Все вместе они подавляют экспрессию белка детерминации миобластов MyoD (myoblast determination protein), препят-

ствуя осуществлению клеточного цикла. (Нокаут генов Hey1 and Heyl, как показали исследования S. Fukada с соавторами (2011), ведет к преждевременной активации MyoD в покоящихся СК [49]).

В ответ на физическую нагрузку и при повреждении мышечной ткани происходит активация покоящихся СК, далее их пролиферация и дифференцировка в миогенном направлении, образование миобластов (миогенных прогениторных клеток) и миоцитов, слияние последних в миотубы с последующим созреванием в мышечные волокна — таким образом, осуществляется весь процесс миогенеза [1, 50] (рис. 2). Транскрипционные факторы Pax3 и Pax7 индуцируют экспрессию генов, активирующих пролиферацию СК и их дифференцировку в миобласты, и подавляют экспрессию генов, которые индуцируют терминальную миогенную дифференцировку [51]. При этом факторы семейства Pax регулируют транскрипцию миогенных регуляторных факторов (MRFs), которые отвечают как за программирование СК на дифференцировку в миобласты, так и за регуляцию самой миогенной дифференцировки.

В период активации СК (их миогенного программирования и дифференцировки) наблюдается нарастающая экспрессия миогенных регуляторных факторов MYF5, MYOD1 и MYOG (миогенина), индуцируемая и регулируемая факторами Pax3 и Pax7 [52—55]. Поскольку СК с фенотипом MYF5+ и миобласты с фенотипом MYOD1+ обладают низким регенеративным потенциалом и не способны к самоподдержанию, миогенные факторы MYF5 и MYOD1 рассматриваются как факторы детерминации СК. По мере уменьшения экспрессии Pax7 и увеличения экспрессии MyoD и миогенина в фазу дифференцировки [56]. Перед терминальной дифференцировкой, которую инициирует миогенин, после образования достаточного количества миобластов экспрессия фактора Pax7 полностью подавляется.

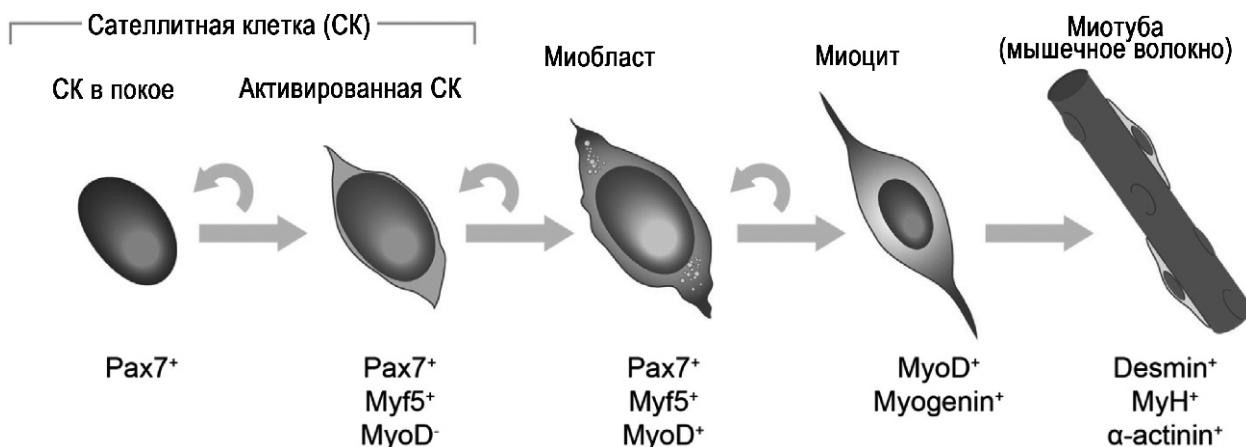


Рис. 2. Последовательность этапов постнатального миогенеза — от СК к мышечным волокнам (К. McCullagh, R. Perlingeiro, 2014 [1]).



### Характеристики сателлитных клеток

**Самоподдержание (самообновление).** СК — миогенные стволовые клетки, обладающие одной из важнейших характеристик «стволовости» — способностью к самоподдержанию. Это их свойство нашло подтверждение в целом ряде исследований. Так, трансплантация всего лишь семи СК в мышцы мышей mdx, получивших значительные дозы радиационного облучения и неспособных к мышечной регенерации, приводит к образованию сотен новых мышечных волокон и ассоциированных с ними СК [32]. При этом новообразованные СК поддерживают мышечную регенерацию на протяжении последующих раундов нанесения повреждений и легко выделяются повторно [30]. Проведенная трансплантация одиночных миофибрилл в мышцу мышей также подтверждает, что СК — это миогенные стволовые клетки, так как они могут образовывать как новые миофибриллы, так и новые СК [30, 58]. Эксперименты по долговременному «отслеживанию» метки в трансгенных H2B-GFP-мышцах выявили, что в физиологических условиях часть СК с фенотипом PAX7+ может оставаться в состоянии покоя в течение практически всей жизни животного, сохраняя при этом способность к самоподдержанию [59]. Исследование А. Сассо с соавторами (2008), в котором использовали клональный анализ культур СК и биоломисцентную визуализацию СК после их трансплантации в мышцы мышей mdx [57], показало, что потомки одной СК (фенотип Pax7+) обладают способностью как к самоподдержанию и интенсивной пролиферации, так и к дифференцировке с образованием мышечных волокон.

Процесс самоподдержания стволовых СК осуществляется за счет их асимметричного и симметричного делений. Асимметричное деление происходит с образованием двух дочерних клеток: одной — запрограммированной на самообновление, другой — на миогенную дифференцировку [32, 58—61]. При этом обе клетки обмениваются сигналами обратной связи для дальнейшего подтверждения их противоположных судеб, а дельта-подобный лиганд 1 (DLL1) сигнального пути Notch экспрессируется в прогениторной клетке (запрограммированной на миогенную дифференцировку), тем самым обеспечивая состояние покоя другой дочерней клетки — стволовой [61]. Как показали исследования, ингибирование Notch приводит к утрате популяции стволовых СК.

Симметричное деление стволовых СК, с образованием двух дочерних клеток, идентичных материнской, поддерживает численность СК на протяжении циклов повреждения — регенерации мышечной ткани. В этом процессе активную роль играет белок Wnt7a, секретруемый регенерирующими мышечными волокнами. Он активирует механизм плоскостной поляризации клеток,

приводящей к ее симметричному делению с образованием двух одинаковых дочерних стволовых клеток [62]. По данным С. Bentzinger с соавторами (2014), экспозиция *ex vivo* стволовых СК с белком Wnt7a перед трансплантацией способствует более высокой приживаемости этих клеток в мышцах [63].

Баланс между симметричным и асимметричным клеточным делением четко регулируется путем дополнительной обратной связи с нишей СК [62].

**Мультипотентность.** Наряду с миогенным потенциалом выявлена также способность СК к мультипотентной дифференцировке (еще одна характеристика «стволовости» клеток). Так, при добавлении адипогенных и остеогенных индуцирующих факторов — BMP4/BMP7 и MDI-I соответственно — в культуру СК последние дифференцируются в адипогенном и остеогенном направлении [64, 65]. А при контакте с PDGF-BB (тромбоцитарным фактором роста BB) и DLL4 (дельта-подобным лигандом 4 Notch), секретруемыми эндотелиальными клетками, СК дифференцируются в перициты — ассоциированные с эндотелием мезенхимные клетки [66]. Однако остается неизвестным, все ли СК обладают потенциалом к дифференцировке в немиогенные клеточные линии или только некоторые их субпопуляции.

**Гетерогенность.** Популяция СК крайне неоднородна: эти клетки различаются между собой не только по паттерну экспрессии генов (о чем свидетельствует переменная экспрессия таких маркеров, как Pax7, MYF5, CD34 [59, 67]), но и по способности к самоподдержанию, запрограммированности к миогенной дифференцировке и пролиферативному потенциалу. Так, было установлено, что субпопуляции СК значительно различаются по уровню экспрессии гена Pax7 (уникального маркера СК, играющего критическую роль в их функционировании) [40, 42, 43]. Из мышц трансгенных мышей Pax7-GFP, у которых экспрессия GFP коррелирует с экспрессией Pax7, с помощью флуоресцентно-активированного клеточного сортирования были выделены покоящиеся СК, которые разделили на субпопуляции с высоким и низким уровнем экспрессии гена Pax7. Клетки с высоким уровнем экспрессии Pax7 обладают более низкой метаболической активностью, меньшей скоростью пролиферации и большей устойчивостью к дифференцировке по сравнению с клетками с низким уровнем экспрессии этого гена [59]. Авторы также выявили, что во время деления в клетках с высоким уровнем экспрессии Pax7 хромосомы расходятся асимметрично с образованием дочерней клетки, тогда как в клетках с низкой экспрессией PAX7 наблюдается случайное (случайное) расхождение хромосом.

Известно, что покоящиеся СК характеризуются экспрессией гена Pax7 и отсутствием экспрессии MyoD. Активированные СК, напротив, отличаются

стабильной экспрессией генов *MyoD* и/или *Myf5* [32]. Однако в других работах было показано, что в миобластах и в популяции СК культивируемого мышечного волокна присутствует субпопуляция СК с фенотипом  $Pax7^+/MyoD^+$ , экспрессия гена *MyoD* в которых подавлена. Эта субпопуляция характеризуется устойчивостью к дифференцировке в миобласты и находится в митотически неактивном состоянии, сходным с состоянием покоя [57, 68].

Исследования *in vivo*, проведенные с использованием метода непрерывного мечения СК крысы бромдезоксифурином (BrdU, аналогом тимидина), выявили гетерогенность популяции СК по степени пролиферативной активности. Было установлено, что подавляющее большинство этих клеток (примерно 80%) быстро вступали в клеточный цикл и способствовали образованию новых мышечных волокон, тогда как остальные — «резервная» субпопуляция (20%) — обладали гораздо меньшей скоростью пролиферации и были устойчивы к дифференцировке в миобласты [45].

Эксперименты по трансплантации свежееизолированных СК показали также, что лишь небольшая часть пересаженных клеток обладала способностью к повторному заселению ниши СК [30]. Полученные данные позволяют предположить, что «истинные» стволовые клетки, ограничиваются только определенной их субпопуляцией, а не всем клеточным пулом [45, 69]. Подтверждением этому может служить исследование V. Shinin с соавторами (2006), которые показали, что лишь ограниченное число СК в мышцах взрослых мышей сохраняют метку BrdU, то есть являются «истинными» стволовыми клетками с неэквивалентными нитями ДНК, защищенными от ошибок в репликации [60].

По всей видимости, популяцию СК можно разделить на две основные субпопуляции: запрограммированные к миогенной дифференцировке прогениторные (коммитированные) клетки и стволовые клетки. Последние, за счет асимметричного деления, способны давать начало миогенным прогениторным клеткам и постоянно поддерживать пул стволовых СК [41].

S. Kuang с соавторами (2007) изучали клеточные линии мышечной, несущие репортерные аллели генов *Myf5-Cre* и *Rosa26YFP* и выявили субпопуляцию СК, в которых отсутствовала экспрессия гена *Myf5* [61]. Такие клетки с фенотипом *Myf5*- составляли незначительную часть (примерно 10%) от общего числа СК, экспрессирующих транскрипционный фактор *Pax7*. Они обладали высоким регенеративным потенциалом и способностью к более быстрому повторному заселению ниши СК по сравнению с прогениторными клетками, имеющими фенотип *Myf5*+. Трансплантация последних в мышечную ткань приводила к их преждевременной дифференцировке и ограниченной миграции, в то время как клетки с феноти-

пом  $Pax7^+/Myf5$ - активно пополняли пул СК всей мышечной ткани [45].

Возможно, именно клетки с фенотипом  $Pax7^+/Myf5$ - и представляют собой популяцию «истинных» стволовых СК, так как являются представителями клеточных линий, берущих начало от популяции эмбриональных прогениторных клеток с фенотипом  $Pax^+/MRF$ -.

### Перспективы клинического применения сателлитных клеток при мышечных дистрофиях

Сателлитные клетки и миобласты, полученные в процессе культивирования, — это первые клетки, использованные в доклинических и клинических исследованиях по применению клеточной терапии у пациентов с мышечными дистрофиями [1, 14, 20, 45]. Так, в доклинических исследованиях была продемонстрирована способность трансплантированных миобластов, полученных из мышц мышцей дикого типа, восстанавливать экспрессию дистрофина в мышцах мышцей mdx [70]. В то же время клинические исследования по применению у пациентов с DMD аллогенных миобластов, полученных из мышц близких родственников, не выявили функционального и клинического улучшения. Эффективность выработки дистрофина в мышечных волокнах пациентов с DMD составила менее 1%; также были отмечены ограниченная миграция миобластов из мест инъекции и плохая приживаемость клеток. Однако последний факт можно объяснить, по всей видимости, их иммунным отторжением, поскольку аналогичное клиническое исследование, в котором трансплантация аллогенных миобластов проводилась на фоне грамотно подобранной иммуносупрессии, показало, что количество волокон, продуцирующих дистрофин, уже через месяц после трансплантации составило 10% [60—74].

В процессе культивирования СК их миогенный потенциал значительно снижается по сравнению с таковым *in vivo*. Решение этой проблемы является одной из ключевых задач, принципиально важных для разработки клеточной медицинской технологии, основанной на использовании СК [20].

Есть также и проблемы клинического применения технологии с использованием СК, связанные с низкой экспансией миобластов, поскольку они имеют ограниченный срок жизни, не способны к длительному делению в условиях *in vitro*, а с возрастом эти характеристики усугубляются, и особенно у больных мышечными дистрофиями [75].

Ключевая роль СК в регенерации скелетных мышц диктует необходимость продолжения изучения возможностей их применения в регенеративной медицине. В настоящее время в Университете Квебека (Канада) идет набор волонтеров для участия в I/II фазе клинического

исследования (NCT02196467) эффектов внутримышечных инъекций культивированных аллогенных миообластов на фоне иммунодепрессантов. В ходе испытаний миообласты, полученные из скелетных мышц здоровых доноров, вводят пациентам с мышечной дистрофией Дюшена [76]. Ранее, в Ia фазу этого исследования, было установлено, что трансплантация аллогенных миообластов способствует восстановлению продукции дистрофина в мышечных волокнах [77].

Сегодня разрабатываются и другие стратегии, которые позволили бы использовать СК с максимальной эффективностью. Основная задача, стоящая перед исследователями, заключается в том, чтобы добиться высокой экспансии СК/миообластов в культуре без потери ими миогенного и регенеративного потенциалов. Как один из перспективных вариантов рассматривается применение генетически модифицированных (например, посредством лентивирусной сверхэкспрессии гена *Pax7*) аутологичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs), выделенных из скелетных мышц пациентов с DMD и индуцированных в направлении миогенной дифференцировки. Доклинические исследования трансплантации полученных таким способом СК/миообластов человека в мышцы мышей *mdx* продемонстрировали приживаемость трансплантированных клеток человека и образование содержащих дистрофин мышечных волокон [78]. Однако внедрение описанного подхода в медицинскую практику требует проведения исследований, достоверно доказывающих безопасность применения перепрограммированных соматических клеток.

Еще одна инновационная стратегия использования СК в клеточной терапии базируется на биоинженерных разработках, предусматривающих создание матрикса, имитирующего нишу СК *in vivo*. Ниша стволовых тканеспецифичных клеток представляет собой анатомически определенное микроокружение этих клеток и является чрезвычайно важной для регуляции их поведения. Ниша СК расположена между плазмолеммой миофибриллы и базальной пластинкой, так что в ее апикальной части СК получают сигналы от миофибрилл, а в базальной — от базальной пластинки. Именно в соответствии с этими сигналами СК выбирают или путь самообновления, или путь дифференцировки [79, 80]. Важно, что взаимодействия между нишей и СК реципрокны: СК также экспрессируют ряд молекул для взаимосвязи с компонентами ниши. В результате этих сложных взаимодействий и происходит регуляция процессов самоподдержания и дифференцировки СК [81—83].

Совершенно очевидно, что зависимость СК от регулирующего влияния ниши — одна из возможных причин потери их миогенного потенциала в процессе культивирования после извлечения из мышечной ткани [84, 85].

Доказательством тому служат эксперименты по трансплантации изолированных мышечных волокон в мышцы мышей, поврежденные радиацией. Эти исследования показали, что из нескольких СК пересаженного мышечного волокна образуется более 100 новых мышечных волокон, содержащих тысячи мышечных ядер [58, 79].

В связи с этим одним из эффективных способов оптимизации культивирования СК/миообластов может стать использование матрикса (скаффолда), в условиях *in vitro* имитирующего нишу этих клеток. Так, С. Bentzinger с соавторами (2013) показали, что добавление в культуральную среду субстратов и/или белков МКМ, таких, как фибронектин или коллаген VI, способствует в условиях *in vitro* активации процесса самоподдержания СК и повышению их регенеративного потенциала [62].

Исследование, проведенное с использованием матрикса из полиэтиленгликоля, имитирующего структуру мышечной ткани, подтвердило, что культивированные СК в таких условиях сохраняли способность к самоподдержанию и их приживаемость была сравнима с трансплантацией свежесделанных СК [86].

Исследования, проведенные С. Bentzinger с соавторами (2014), которые показали, что экспозиция в течение нескольких часов *ex vivo* свежесделанных СК с белком *Wnt7a* (белок, секретируемый регенерирующими мышечными волокнами) способствует увеличению миграционной способности клеток после внутримышечной трансплантации за счет стимуляции сигнального пути, регулирующего плоскостную поляризацию данных клеток [63].

Следует отметить, что идентификация субпопуляции «истинных» стволовых СК (к примеру, *Pax7+*/*Myf5-* или еще менее комитированных клеток-предшественников) будет способствовать повышению миогенного и регенеративного потенциалов культивированных СК/миообластов.

В этом плане особый интерес представляют исследования С. Collins с соавторами (2005), которые показали, что трансплантированные СК, выделенные из различных групп мышц организма, могут обладать различным регенеративным потенциалом [79]. Так, в результате трансплантации в мышцы мышей СК, выделенных из EDL-мышц, были получены более крупные кластеры мышц за более короткий срок (3 недели), чем при применении СК, выделенных из TA-мышц (5 недель).

Таким образом, возможность идентификации СК, обладающих наиболее высокими регенеративным потенциалом и способностью к самоподдержанию, а также разработка оптимального «прототипа» ниши помогут создать наиболее эффективную клеточную технологию для лечения пациентов с мышечными заболеваниями.



## Заключение

Применение СК в качестве ключевой составляющей клеточной терапии пациентов с мышечными заболеваниями, как и любой метод, имеет свои плюсы и минусы. К его доказанным преимуществам следует отнести:

- надежную идентификацию СК как по их анатомической локализации (расположению под базальной мембраной мышечного волокна), так и по экспрессии ряда хорошо изученных маркеров, позволяющих исследовать процессы самоподдержания и дифференцировки *in vivo*;
- возможность использования автоматизированных методов (FACS) для быстрого выделения СК благодаря экспрессии ими ряда хорошо изученных маркеров (таблица);
- изученность условий культивирования СК, что позволяет проводить *in vitro* амплификацию и модификацию (фармакологическую или генетическую) СК перед их трансплантацией;
- способность СК к самоподдержанию и миогенной дифференцировке;
- возможность идентифицировать наименее коммитированные клетки;
- исследованность программы дифференцировки: получено достаточно много данных относительно транскрипционной сети, регулирующей активацию, пролиферацию и дифференцировку СК (рис. 2), что открывает возможность управления функционированием и программированием СК перед трансплантацией и после нее;
- доказанность эффективности использования СК и их производных в регенеративной медицине в доклинических и клинических исследованиях.

Ряд исследователей отмечает известные на сегодняшний день недостатки использования СК в клеточной терапии мышечных дистрофий: невозможность системного введения — в настоящее время СК и их производные используются только для внутримышечных инъекций; ограниченность миграции трансплантированных миобластов из мест инъекции; отторжение введенных клеток иммунной системой реципиента, так как трансплантируют пока только аллогенные миобласты, что требует использования иммунодепрессантов; снижение миогенного потенциала СК в процессе их культивирования.

Однако проблемы, обусловленные «несовершенством» терапии СК, служат дополнительной мотивацией для поиска новых путей их решения — как с применением сателлитных клеток и их производных, так и других клеточных популяций, обладающих миогенным потенциалом.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-25-00166).*

## References

1. McCullagh K., Perlingeiro R. Coaxing stem cells for skeletal muscle repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015; 84: 198-207.
2. Shi X., Garry D.J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 2006; 20: 1692-708.
3. Kobayashi Y., Rader E., Crawford R. et al. Sarcolemma-localized nNOS is required to maintain activity after mild exercise. *Nature.* 2008; 456: 511-5.
4. Kazuki Y., Hiratsuka M., Takiguchi M. et al. Complete genetic correction of iPS cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther.* 2010; 18: 386-93.
5. Tedesco F., Hoshiya H., D'Antona G. et al. Stem cell-mediated transfer of a human artificial chromosome ameliorates muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 2011; 3: 96-78.
6. Rahimov F., Kunkel L. The cell biology of disease: cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *J Cell Biol.* 2013; 201(4): 499-510.
7. Emery A. The muscular dystrophies. *Lancet.* 2002; 359: 687-695.
8. Ehmsen J., Poon E., Davies K. The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Sci.* 2002; 12: 2801-3.
9. Durbeej M., Campbell K. Muscular dystrophies involving the dystrophin glycoprotein complex an overview of current models. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2002; 12: 349-61.
10. Sinha M., Jang Y., Oh J., Khong D. et al. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. *Science.* 2014; 344: 649-52.
11. Matsumura K., Ohlendieck K., Ionasescu V. et al. The role of the dystrophin-glycoprotein complex in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord.* 1993; 3: 533-5.
12. Dalkilic L., Kunkel L. Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003; 13: 231-8.
13. Emery A. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases- a world survey. *Neuromuscular Disorders.* 1991; 1: 19-29.
14. Farini A., Razini P., Erratico S. et al. Cell Based Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *J Cell. Physiol.* 2009; 221: 526-34.
15. Biggar W., Harris V., Eliasoph L. Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. *Neuromuscul Disord.* 2006; 6: 249-55.
16. McClorey G., Moulton H., Iversen P. et al. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restores dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD. *Gene Ther.* 2006; 13: 1373-81.
17. Chamberlain J. Gene therapy of muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2002; 11: 2355-62.
18. Long C., McAnally J., Shelton J. et al. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science.* 2014; 345(6201):1184-8.
19. Xiaozhong S., Garry D. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes and Development.* 2006; 20(13):1692-708.
20. Meregalli M., Farini A., Sitziaand G., Torrente Y. Advancements in stem cells treatment of skeletal musclewasting. *Pathophysiology of skeletal muscle.* 2014; 5:1-12.
21. Flanigan K., Campbell K., Viollet L. et al. Anti-dystrophin Tcell responses in Duchenne muscular dystrophy: prevalence and a glucocorticoid treatment effect. *Hum. Gene Ther.* 2013; 24: 797-806.
22. Buckingham M., Bajard L., Chang T. et al. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat.* 2003; 202: 59-68.



23. Judson R., Zhang R., Rossi F. Tissue-resident mesenchymal stem/progenitor cells in skeletal muscle: collaborators or saboteurs? *FEBS Journal*. 2013; 280: 4100-8.
24. Burdzinska A., Gala K., Pczek L. Myogenic stem cells. *Folia Histochem Cytobiol*. 2008; 46 (4): 401-12.
25. Petrof B., Shrager J., Stedman H. et al. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993; 90: 3710-4.
26. Blau H., Webster C., Pavlath G. Defective myoblasts identified in Duchenne muscular dystrophy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1983; 80: 4856-60.
27. Gros J., Manceau M., Thome V. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature*. 2005; 435: 954-8.
28. Seale P., Asakura A., Rudnicki M. The potential of muscle stem cells. *Dev. Cell*. 2001; 1: 333-42.
29. Charge S., Rudnicki M. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev*. 2004; 84: 209-38.
30. Collins C., Partridge T. Self-renewal of the adult skeletal muscle satellite cell. *Cell Cycle*. 2005; 4: 1338-41.
31. Anderson J. The satellite cell as a companion in skeletal muscle plasticity: currency, conveyance, clue, connector and colander. *J. Exp. Biol*. 2006; 209: 2276-2292.
32. Zammit P., Partridge T., Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: The stem cell that came in from the cold. *J of Histochemistry and Cytochemistry*. 2006; 54: 1177-91.
33. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J of Biophysical and Biochemical Cytology*. 1961; 9: 493-5.
34. Sambasivan R., Tajbakhsh S. Skeletal muscle stem cell birth and properties. *Cell Dev. Biol*. 2007; 18: 870-82.
35. Ordahl C., Williams B., Denetclaw W. Determination and morphogenesis in myogenic progenitor cells: An experimental embryological approach. *Curr. Top. Dev. Biol*. 2000; 48: 319-67.
36. Odintsova I.A., Chepurnenko M.N., Komarova A.S. Myogenic satellite cells are a cambial reserve of muscle tissue. *Genes and cells*. 2014; 9 (1): 6-14. (in Russian)
37. Fukada S., Uezumi A., Ikemoto M. et al. Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. *Stem Cells*. 2007; 25: 2448-59.
38. Gnocchi V., White R., Ono Y. et al. Further characterisation of the molecular signature of quiescent and activated mouse muscle satellite cells. *PLoS ONE*. 2009; 4: 5205.
39. Seale P., Sabourin L., Gargis-Gabardo A. et al. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*. 2000; 102: 777-86.
40. Wang Y., Dumont N., Rudnicki M. Muscle stem cells at a glance. *J of Cell Science*. 2014; 127: 1-6.
41. Relaix F., Montarras D., Zaffran S. et al. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J of Cell Biology*. 2006; 172: 91-102.
42. Day K., Shefer G., Richardson J. et al. Nestin-GFP reporter expression defines the quiescent state of skeletal muscle satellite cells. *Developmental Biology*. 2007; 304: 246-59.
43. Horst D., Ustanina S., Sergi C. et al. Comparative expression analysis of Pax3 and Pax7 during mouse myogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*. 2006; 50: 47-54.
44. Chang N., Rudnicki M. Satellite cells: The Architects of skeletal muscle current topics. *The International Journal of Developmental Biology*. 2014; 107: 161-77.
45. Kuang S., Charge S., Seale P. et al. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *The Journal of Cell Biology*. 2006; 172: 103-13.
46. Grounds M., McGeachie J. A model of myogenesis in vivo, derived from detailed autoradiographic studies of regenerating skeletal muscle, challenges the concept of quantal mitosis. *Cell Tissue Res*. 1987; 250: 563-9.
47. Bjornson C., Cheung T., Liu L. et al. Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. *Stem Cells*. 2012; 30: 232-42.
48. Wen Y., Bi P., Liu W., Asakura A. Constitutive Notch activation upregulates Pax7 and promotes the self-renewal of skeletal muscle satellite cells. *Mol. Cell. Biol*. 2012; 32: 2300-11.
49. Fukada S., Yamaguchi M., Kokubo H. et al. Hesr1 and Hes3 are essential to generate undifferentiated quiescent satellite cells and to maintain satellite cell numbers. *Development*. 2011; 138: 4609-19.
50. Kuang S., Rudnicki M. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends in Molecular Medicine*. 2007; 14(2): 82-91.
51. Soleimani V., PUNCH V., Kawabe Y. et al. Transcriptional dominance of Pax7 in adult myogenesis is due to high-affinity recognition of homeodomain motifs. *Developmental Cell*. 2012; 22: 1208-20.
52. Bentzinger C., Wang Y., Rudnicki M. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012; 4 (2). pii: a008342. doi: 10.1101/cshperspect.a008342.
53. Moncaut N., Rigby P., Carvajal J. Dial M (RF) for myogenesis. *FEBS J*. 2013; 280: 3980-90.
54. Hu P., Geles K., Paik J., DePinho R. et al. Codependent activators direct myoblast-specific MyoD transcription. *Developmental Cell*. 2008; 15: 534-46.
55. McKinnell I., Ishibashi J., Le Grand F. et al. Pax7 activates myogenic genes by recruitment of a histone methyltransferase complex. *Nature Cell Biology*. 2008; 10: 77-84.
56. Olguin H., Olwin B. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: A potential mechanism for self-renewal. *Developmental Biology*. 2004; 275: 375-88.
57. Sacco A., Doyonnas R., Kraft P. et al. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature*. 2008; 456: 502-6.
58. Rocheteau P., Gayraud-Morel B., Siegl-Cachedenier I. et al. A subpopulation of adult skeletal muscle stem cells retains all template DNA strands after cell division. *Cell*. 2012; 148: 112-25.
59. Chakkalakal J., Jones K., Basson M. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature*. 2012; 490: 355-60.
60. Shinin V., Gayraud-Morel B., Gomes D. Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nat Cell Biol*. 2006; 8: 677-87.
61. Kuang S., Kuroda K., Le Grand F., Rudnicki M. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell*. 2007; 129: 999-1010.
62. Bentzinger C., Wang Y., von Maltzahn J. et al. Fibronectin regulates Wnt7a signaling and satellite cell expansion. *Cell Stem Cell*. 2013; 12: 75-87.
63. Bentzinger C., von Maltzahn J., Dumont N., et al. Wnt7a stimulates myogenic stem cell motility and engraftment resulting in improved muscle strength. *J Cell Biol*. 2014; 205: 97-111.
64. Asakura A., Komaki M., Rudnicki M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation*. 2001; 68: 245-53.
65. Yin H., Pasut A., Soleimani V. et al. MicroRNA-133 controls brown adipose determination in skeletal muscle satellite cells by targeting Prdm16. *Cell Metabolism*. 2013; 17: 210-24.

66. Cappellari O., Benedetti S., Innocenzi A. et al. Dll4 and PDGF-BB convert committed skeletal myoblasts to pericytes without erasing their myogenic memory. *Developmental Cell*. 2013; 24: 586-99.
67. Beauchamp J., Heslop L., Yu D., Tajbakhsh S. Expression of CD34 and MYF5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol*. 2000; 151: 1221-34.
68. Zammit P., Golding J., Nagata Y. et al. Muscle satellite cells adopt divergent fates: A mechanism for self-renewal? *The Journal of Cell Biology*. 2004; 166: 347-57.
69. Beauchamp J. R., Morgan J. E., Pagel C.T. A. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *The Journal of Cell Biology*. 1999; 144: 1113-22.
70. Partridge T., Morgan J., Coulton G. et al. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature*. 1989; 337: 176-9.
71. Gussoni E., Pavlath G., Lanctot A. et al. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature*. 1992; 356: 435-8.
72. Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C.D. et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 1999; 401: 390-4.
73. Camirand G., Rousseau J., Ducharme M. et al. Dystrophin expression in miofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells. *Molecular Therapy*. 2004; 9 (3): 475-82.
74. Peault B., Rudnicki M., Torrente Y. et al. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther*. 2007; 15: 867-77.
75. Conboy I., Conboy M., Wagers A. et al. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*. 2005; 433: 760-4.
76. Transplantation of Myoblasts to Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Patients. Available at: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT02196467> (assessed 5 May 2015).
77. Skuk D., Goulet M., Roy B. et al. Dystrophin expression in muscles of duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells. *J Neuropathol Exp. Neurol*. 2006; 65 (4): 371-86.
78. Darabi R., Arpke R., Irion S. et al. Human ES- and iPS-derived myogenic progenitors restore DYSTROPHIN and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice. *Cell Stem Cell*. 2012; 10: 610-19.
79. Collins C., Olsen I., Zammit P. et al. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell*. 2005; 122: 289-301.
80. Cosgrove B., Sacco A., Gilbert P., Blau H. A home away from home: challenges and opportunities in engineering in vitro muscle satellite cell niches. *Differentiation*. 2009; 78: 185-94.
81. Golding J., Calderbank E., Partridge T. Skeletal muscle stem cells express anti-apoptotic ErbB receptors during a transition from quiescence. *Exp. Cell. Res*. 2007; 313: 341-56.
82. Le Grand F., Jones A., Seale V. et al. Wnt 7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009; 4: 535-47.
83. Brack A., Rando T. Intrinsic changes and extrinsic influences of myogenic stem cell function during aging. *Stem Cell Rev*. 2007; 3: 226-37.
84. Dykstra B., Ramunas J., Kent D. et al. High-resolution videomonitoring of hematopoietic stem cells cultured in single-cell array identifies new features of self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2006; 103: 8185-90.
85. Kuang S., Gillespie M., Rudnicki M. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell*. 2008; 2: 22-31.
86. Gilbert P., Havenstrite K., Magnusson K. et al. Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science*. 2010; 329: 1078-81.

Received 28.05.15

### Сведения об авторах:

Зорин Вадим Леонидович, к.биол.н., зав. отд. регенеративной медицины, Институт стволовых клеток человека

Зорина Алла Ивановна, к.м.н., гл. науч. сотр., Институт стволовых клеток человека

Пулин Андрей Алексеевич, к.м.н., зав. криобанком Центра биомедицинских технологий, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

Копнин Павел Борисович, к.м.н., зав. лаб. цитогенетики, НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

Малышев И.Ю.

## **Феномены и сигнальные механизмы репрограммирования макрофагов**

Московский Государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Министерство образования и науки России, 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». Федеральное агентство научных организаций, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

*Процесс смены фенотипа макрофагов называется «репрограммированием». Репрограммирование играет центральную роль в иммунном ответе. Для репрограммированных макрофагов характерны четыре феномена: феномен усиления ответа макрофагов как на репрограммирующий фактор (прямое усиление), так и на другой фактор (перекрестное усиление); феномен реципрокного подавления альтернативного фенотипа; феномен каскадной активации механизмов репрограммирования и феномен положительных и обратных связей. Формирование этих феноменов обеспечивают внутриклеточные сигнальные пути, такие, как JNK-; PI3K/Akt-; Notch-; JAK/STAT-; TGF- $\beta$ -; TLR/NF- $\kappa$ B- и гипоксия-зависимые сигнальные пути. Анализ сигнальных механизмов репрограммирования позволил сделать несколько выводов. 1. Существует относительная специализация сигнальных путей в репрограммировании макрофагов на действие разных компонентов микроокружения; 2. Сигнальные пути, которые вовлечены в репрограммирование макрофагов можно разделить на пути, которые программируют M1 фенотип и пути, которые программируют M2 фенотип; 3. Понимание сигнальных путей помогает объяснить основные феномены репрограммирования. Так, в основе феномена усиления ответа репрограммированных макрофагов лежит конвергенция сигнальных путей на уровне определенного белка; в основе феномена реципрокного подавления альтернативного фенотипа макрофагов лежит тот факт, что формирование одного фенотипа сопровождается усилением синтеза молекул, которые подавляют альтернативный фенотип; в основе феномена каскадной активации сигнальных путей репрограммирования лежит способность одного пути передавать сигналы на другой путь и в основе феномена положительных и отрицательных обратных связей лежит способность сигнального пути увеличивать синтез, как активаторов этого пути, так и ингибиторов; 4. Сигнальные пути, которые передают сигнал от провоспалительных факторов и программируют провоспалительный M1 фенотип макрофагов, часто имеют ответвление, которое при его активации может увеличить продукцию противовоспалительных M2 цитокинов; и наоборот. Поскольку нарушение репрограммирования макрофагов играет важную роль в развитии многих заболеваний, понимание сигнальных механизмов репрограммирования, окажет помощь в выборе эффективных терапевтических мишеней при разработке новых способов коррекции нарушенного иммунитета.*

**Ключевые слова:** макрофаги; иммунитет; репрограммирование; цитокины; сигнальные механизмы; факторы транскрипции

Malyshev I.Yu.

## **Phenomena and signaling mechanisms of macrophage reprogramming**

Moscow 1state medico-stomatological University. A.I. Evdokimov. The Ministry of education and science of Russia, 127473, Moscow, Russia  
Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of general pathology and pathophysiology», 125315, Moscow, Russia

*The process of changing the phenotype of macrophages is called «reprogramming.» Reprogramming plays a central role in the immune response. Reprogrammed macrophages are characterized by four phenomena: the phenomenon of the gain response of macrophages on the reprogramming factor (direct gain), and the other factor (cross-gain); phenomenon of reciprocal suppression of alternative phenotypes; phenomenon of cascade activation for mechanisms of reprogramming and the phenomenon of positive and negative feedbacks. The formation of these phenomena provide the intracellular signaling pathways, such as JNK-; PI3K/Akt-; Notch-; JAK/STAT-; TGF- $\beta$ -; TLR/NF- $\kappa$ B- and hypoxia-dependent signaling pathways. Analysis of the signaling mechanisms of reprogramming led to several conclusions: 1. There is a relative specialization of signaling pathways in macrophages reprogramming on action of different components of the microenvironment; 2. signaling pathways that are involved in reprogramming of macrophages can be divided in the way that program M1 phenotype and the way that program M2 phenotype; 3. Understanding the signaling pathways helps to explain the basic phenomena of reprogramming. Thus, the phenomenon of the gain response of reprogrammed macrophages is provided by convergence signaling pathways at specific protein; phenomenon of reciprocal suppression alternative macrophage phenotype is provided by that the formation of one phenotype is accompanied by increased synthesis of molecules that inhibit an alternative phenotype; at the*

*heart of the phenomenon of cascade activation of signaling pathways is the ability one way to transmit signals over a different path and the basis for the phenomenon of positive and negative feedback is the ability to increase the synthesis of the activators and inhibitors of this pathway. 4. Signalling pathways that transmit the signal from the proinflammatory factors and programm proinflammatory M1 phenotype of macrophages are often branching, which, when activated, may increase the production of anti-inflammatory M2 cytokines; and vice versa. Since the violation reprogramming of macrophages plays an important role in the development of many diseases, understanding the signaling mechanisms of reprogramming, will assist in the selection of effective therapeutic targets to develop new ways of correction of impaired immunity.*

**Key words:** *macrophages; the immune system; reprogramming; cytokines; signaling pathways; transcription factors*

Каждый день на человека действуют разные патогенные факторы. Это микробы, канцерогены и переданные от родителей мутации. Для организма жизненно важно быстро уничтожить патогенный фактор и восстановить нарушенный гомеостаз. Поэтому в ходе эволюции была выработана иммунная система, которая решает эти задачи. В этой системе за обнаружение и удаление патогенных клеток отвечают макрофаги. В зависимости от тканевого микроокружения, они приобретают долгосрочный уникальный тканевой фенотип «резидентных» макрофагов, например, фенотип Купфферовских клеток в печени или клеток Лангерганса в коже. Тканевые макрофаги могут быстро менять свой функциональный фенотип. Например, в начале воспаления они имеют провоспалительный M1 фенотип, а в конце — противовоспалительный M2 [1]. Процесс смены функционального фенотипа клетки называется «репрограммированием». Этот процесс играет центральную роль в иммунном ответе, и поэтому его нарушение провоцирует развитие разных болезней.

На фенотип макрофагов влияют иммунные факторы, такие, как цитокины; паттоген-ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП), такие, как липополисахарид (ЛПС), которые распознаются паттерн-распознающими рецепторами (ПРР) макрофагов, например, Toll-like receptors (TLR); и физико-химические факторы, такие, как гипоксия, температура и рН. Факторы, которые сдвигают фенотип макрофага в сторону провоспалительного M1, например IFN- $\gamma$ , обозначают как RF (reprogramming factor)-M1, а в сторону противовоспалительного M2, например IL-4 — как RF-M2 [2]. В обзоре будут рассмотрены ключевые феномены и сигнальные механизмы репрограммирования фенотипа макрофагов.

### **Роль разных фенотипов макрофагов в иммунном ответе**

При встрече с вирусами или бактериями, макрофаги продуцируют воспалительные цитокины, такие, как IL-12 и TNF- $\alpha$  и кемокины [3]. Кемокины при-

влекают в фокус воспаления нейтрофилы, природные киллеры (ПК), Th- и T-лимфоциты. IL-12 и TNF- $\alpha$  действуя на ПК и макрофаги, увеличивают секрецию IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  еще больше стимулирует продукцию IL-12 и TNF- $\alpha$  макрофагами и таким образом усиливает их бактерицидные, противовирусные и антиопухолевые свойства.

Когда макрофаги встречаются с паразитами — грибами или гельминтами, они секретируют много противовоспалительных цитокинов, таких, как IL-4, IL-10, IL-13 и TGF- $\beta$  и другие кемокины [3]. Эти кемокины привлекают Th-лимфоциты, эозинофилы и базофилы, продуцирующие IL-4 и IL-13 [4]. IL-4 и IL-13 еще больше стимулируют макрофаги к секреции IL-10 [4], который снижает продукцию воспалительных цитокинов [5], активных форм кислорода (АФК) и NO, и таким образом, снижает бактерицидные свойства макрофагов.

Реакции макрофагов, ПК, нейтрофилов, базофилов и эозинофилов на микробы или опухолевые клетки знаменуют собой развитие сенсорного и лимфоцит-независимого эффекторного звена иммунного ответа и первую волну программирования макрофагов [2]. При этом провоспалительный фенотип, формирующийся при действии ЛПС и/или IFN- $\gamma$ , получил название M1, а противовоспалительный фенотип, формирующийся при действии IL-4, IL-13 и IL-10 — M2 [6, 7]. Маркерами M1 являются TLR-4, MAPK рецептор, CD25 и CD80, а маркерами M2 — маннозный рецептор, SR-A, CD163, CD209 и FIZZ1 [7].

Для эффективного уничтожения патогенных клеток, макрофаги и АПК запускают формирование лимфоцит-зависимого эффекторного звена иммунного ответа по клеточному или гуморальному типу.

При клеточном типе антиген-презентирующие клетки (АПК) и M1 макрофаги стимулируют дифференцировку Th0 клеток в Th1 клетки, а T клеток в CTL (Cytotoxic T Lymphocytes). M1 клетки вместе Th1 и CTL клетками убивают бактерии, вирусы, инфицированные и опухолевые клетки. Однако избыточная продукция провоспалительных медиаторов M1



фенотипом может приводить к повреждению тканей и развитию болезней. Механизмы переключения с M1 на M2 фенотип могут защитить организм от избыточного воспаления. Вместе с тем, известно, что опухолевые клетки и некоторые микробы сами индуцируют в макрофагах такое переключение, для того чтобы избежать своего уничтожения воспалительными медиаторами [1].

При гуморальном типе ответа, АПК и M2 макрофаги потенцируют развитие Th0 клеток в Th2 [8]. M2 макрофаги вместе с Th2 клетками обезвреживают паразитов и токсины, за счет высвобождения IL-4, который способствует усилению продукции антител В-клетками. [9]. Кроме того, M2 макрофаги участвуют в репарации тканей, ангиогенезе и фагоцитозе апоптотических клеток [10]. Однако избыточная активация M2 макрофагов может спровоцировать аллергические и астматические Th2 реакции [11] и рост опухоли [12].

Интересно, что Th1 клетки и CTL продуцируют провоспалительные цитокины, которые еще больше программируют макрофаги на M1 фенотип, а Th2 клетки — противовоспалительные цитокины, которые еще больше программируют макрофаги на M2 фенотип [7]. Так происходит вторая, возвратная волна программирования макрофагов.

### Феномены репрограммирования макрофагов

Для репрограммированных макрофагов характерны четыре феномена.

1. Феномен усиления ответа макрофагов как на репрограммирующий фактор (прямое усиление), так и на другой фактор (перекрестное усиление). Например, репрограммирование с помощью IFN- $\gamma$  усиливает последующий ответ макрофагов, как на сам IFN- $\gamma$  (прямое усиление), так и на ЛПС (перекрестное усиление).

2. Феномен реципрокного подавления альтернативного фенотипа. Существо феномена состоит в том, что репрограммирование в сторону M1 не только усиливает продукцию провоспалительных цитокинов, но как правило, еще подавляет продукцию противовоспалительных цитокинов, и возможность формирования M2 фенотипа, и наоборот.

3. Феномен каскадной активации механизмов репрограммирования обеспечивает очень быстрое формирование нужного фенотипа макрофагов.

4. Феномен положительных и обратных связей в механизмах репрограммирования. Механизмы положительной обратной связи обеспечивают быстрое формирование нужного функционального фенотипа макрофагов, например, провоспалительного M1 фенотипа при необходимости иммунного ответа уничто-

жить патогенный вирус, бактерию или опухолевую клетку. Механизмы отрицательной обратной связи предупреждают чрезмерную активацию функционального фенотипа, которая, в случае репрограммирования M1 фенотипа, может привести к неконтролируемому воспалению, повреждению здоровых тканей и развитию провоспалительных заболеваний.

Формирование этих феноменов обеспечивают разные внутриклеточные сигнальные пути.

### Сигнальные механизмы репрограммирования

В репрограммирование макрофагов вовлечены внутриклеточные сигнальные JNK-, PI3K/Akt-, Notch-, JAK/STAT-, TGF- $\beta$ /SMAD-/nonSMAD-, TLR/NF- $\kappa$ B- и гипоксия-зависимые пути [13].

#### 1. JNK-сигнальный путь

в репрограммировании макрофагов

JNK (C-Jun N-terminal kinase)-сигнальный путь может быть активирован с рецепторов факторов роста, рецепторов цитокинов и рецепторов, сопряженных с G-белками. Роль JNK-пути в репрограммировании макрофагов была продемонстрирована на макрофагах жировой ткани (МЖТ). МЖТ нормальных мышей имеют M2 фенотип, тогда как МЖТ мышей с ожирением — M1 фенотип [14]. M1 фенотип МЖТ способствуют развитию инсулин-резистентности [14].

JNK-путь играет ключевую роль в репрограммировании МЖТ с противовоспалительного M2 на провоспалительный M1 фенотип и развитии резистентности к инсулину (рис. 1). При ожирении насыщенные жирные кислоты через активацию MLK3 (mixed-lineage kinase 3) активируют JNK, которая активирует

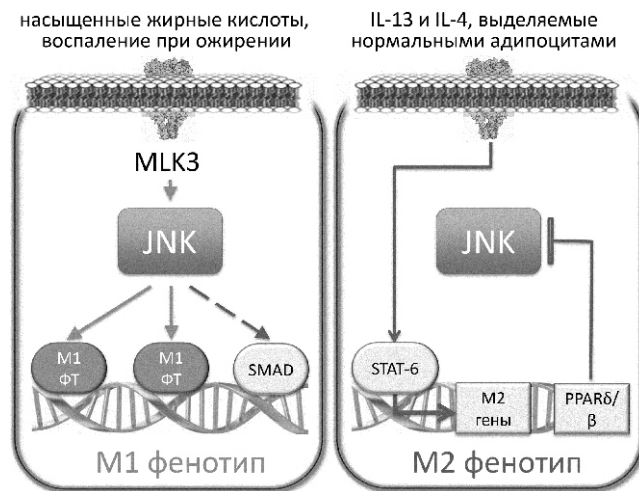


Рис. 1. JNK-сигнальный путь в репрограммировании макрофагов жировой ткани при ожирении и в норме; ФТ — фактор транскрипции.

экспрессию провоспалительных генов, и благодаря этому репрограммирует макрофаги на M1 фенотип [13].

Вместе с тем, JNK может активировать и факторы транскрипции M2 фенотипа, например, SMAD3 [15]. Это позволяет предположить, что при определенных условиях JNK может быть вовлечен в формирование M2 фенотипа макрофагов.

Поддержание M2 фенотипа MЖТ в организме без ожирения связано с тем, что нормальные адипоциты продуцируют RF-M2: IL-13 и IL-4. Эти цитокины активируют в макрофагах фактор транскрипции STAT (signal transducers and activators of transcription)-6, который активирует экспрессию генов M2 фенотипа и гена PPARδ/β (macrophage peroxisome proliferator-activated receptor), который блокирует активацию JNK [17]. Оба эффекта поддерживают M2 фенотип MЖТ (рис. 1).

Таким образом, JNK-зависимый сигнальный путь:

1. Обеспечивает реакцию макрофагов на факторы роста, цитокины, жирные кислоты и лиганды рецепторов, сопряжённых с G-белками;
2. Вовлечен в репрограммирование макрофагов на M1 фенотип;
3. Содержит ответвление на SMAD3, что может ограничивать избыточную продукцию провоспалительных цитокинов.

## 2. PI3K/Akt-сигнальный путь в репрограммировании макрофагов

Фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K) активируется с рецепторов цитокинов и TLR. PI3K катализирует продукцию фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфата (PIP3), который активирует протеинкиназу Akt. Семейство Akt объединяет три киназы Akt1, Akt2, и Akt3.

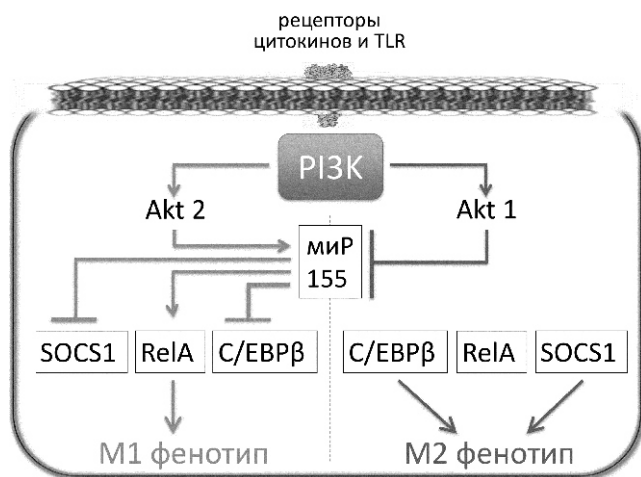


Рис. 2. PI3K/Akt-сигнальный путь в репрограммировании макрофагов.

PI3K/Akt-сигнальный путь играет важную роль в активации и репрограммировании макрофагов [17]. При этом, интересно, что Akt1 способствует формированию M2, а Akt2 — M1 фенотипа [18; 19] (рис. 2). В Akt-зависимом репрограммировании макрофагов ключевую роль играет микроРНК-155 (miR-155) и ее мишень C/EBPβ (CAAT/enhancer-binding proteins β) [18; 20]. Akt2 увеличивает экспрессию miR-155, который активирует фактор транскрипции RelA/NF-κB и ингибирует SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1). Благодаря этому, Akt2 увеличивает экспрессию генов M1 фенотипа, таких, как iNOS и TNF-α. Akt1 напротив ингибирует miR-155, что приводит к увеличению C/EBPβ и увеличению экспрессии генов M2 фенотипа, таких как Arg1 и IL-10 [21].

A. Arranz et al. [18] и A. Androulidaki et al. [2] показали, что ЛПС может активировать Akt1. В результате формируется фенотип, который на провоспалительный фактор (ЛПС) может увеличивать продукцию противовоспалительных медиаторов. Такой фенотип можно назвать как «switch».

Таким образом, PI3K/Akt-зависимый сигнальный путь:

1. Обеспечивает реакцию макрофагов на цитокины и лиганды TLR;
2. Способствует репрограммированию макрофагов на M1 фенотип, благодаря активации Akt2, и на M2 фенотип, благодаря активация Akt1;
3. Может сформировать switch фенотип макрофага, который на провоспалительные стимулы будет отвечать продукцией противовоспалительных медиаторов. Возможность переключения трансляции сигнала между Akt1 и Akt2 в switch фенотипе является одним из механизмов высокой пластичности макрофагов.

## 3. Notch-сигнальный путь в репрограммировании макрофагов

Млекопитающие имеют четыре трансмембранных Notch рецептора (Notch-1, -2, -3 и -4) и пять трансмембранных лигандов Delta-like1 (Dll1), Dll3, Dll4, Jagged-1 и Jagged-2 [22]. Лигирование Notch запускает расщепление Notch с помощью (ADAM)-протеиназы и γ-секретазы (рис. 3) с образованием домена NICD, который затем переносится в ядро [23]. В ядре NICD связывается с RBP-J и активирует экспрессию разных генов [23].

Notch-сигнальный путь вовлечен в репрограммирование макрофагов [23]. Так, показано, что в ответ на ЛПС на поверхности макрофагов увеличивалось количество Dll4 [24]. Это увеличение было опосредовано TLR4/NF-κB-сигнальным путем. Инкубация интактных макрофагов с макрофагами, которые

экспрессировали Dll4 запускала протеолиз Notch в интактных макрофагах (рис. 3). Это приводило к увеличению активности генов M1 фенотип, таких как IL-12, NOS и активации Akt и NF-κB сигнальных путей.

ЛПС/TLR4/NF-κB путь является одним из путей репрограммирования M1 фенотипа макрофагов (см. ниже), который продуцирует лиганды для Notch сигнального пути. Подключение дополнительных путей обеспечивает быстрое репрограммирование M1 фенотипа макрофагов и эффективное удаление патогенных микробов. Это пример феномена каскадной активации путей репрограммирования макрофагов.

Кроме того, Xu et al. [23] показали, что активация Notch1 усиливает образование RBP-J, который увеличивает экспрессию фактора транскрипции IRF8 (interferon regulatory factor 8) в репрограммируемых макрофагах. IRF8 содействует активации воспалительных генов, включая IL-12 [25]. IRF8 вовлечен не только в IFN-γ- и Notch-сигнальные пути, но также и в TLR4-сигнальный путь активации провоспалительных M1 цитокинов [26]. Поэтому последующее действие провоспалительных лигандов через TLR4 на репрограммированный макрофаг с увеличенным содержанием IRF8 будет вызывать больший воспалительный ответ, по сравнению с нерепрограммированными макрофагами. Эта ситуация отражает механизм формирования феномена усиления провоспалительного M1 ответа макрофагов после репрограммирования, в основе которого лежит конвергенция Notch1-RBP-J-, IFN-γ- и TLR4-сигнальных путей на уровне белка IRF8 (рис. 3).

Y.C.Wang et al. [27] показали, что при Notch/RBP-J-зависимом репрограммировании M1 фенотипа макрофагов увеличивается экспрессия SOCS3, ингибитора фактора транскрипции M2 генов STAT3 (рис. 3). Эти данные позволяют понять феномен сопряжения усиления продукции провоспалительных цитокинов со снижением продукции противовоспалительных цитокинов.

Вместе с тем, другие исследователи на макрофагах мышей с системной красной волчанкой показали, что Notch1-сигнальный путь может быть вовлечен и в формирование патогенетического M2 фенотипа [28]. В этом случае активированный патогенными факторами системной красной волчанки Notch1 путь транслировал сигнал через PI3K- и MAPK-пути и ускорял транслокацию NF-κB p50 в ядро. Поскольку димер p50/p50 активирует гены M2 фенотипа [29], Notch1/NF-κBp50-путь репрограммировал макрофаги на M2 фенотип.

Таким образом, Notch-зависимый сигнальный путь:

1. Обеспечивает реакцию макрофагов на Delta-like и JAG лиганды и опосредованно на лиганды TLR4 — ЛПС;

2. Репрограммирует M1 фенотип макрофагов, через активацию NICD, RBP-J и IRF8. При патологии Notch путь может быть вовлечен в формирование M2 фенотипа. В этом случае трансляция сигнала осуществляется через PI3K- и MAP-киназные пути и транслокацию NF-κB p50 в ядро;

3. Благодаря наличию M1-репрограммирующих NICD/RBP-J/IRF8 путей и M2-репрограммирующих PI3K-/MAPK-/NF-κBp50 путей, запускающихся с Notch, Notch-сигналинг, вероятно, может участвовать в формировании switch фенотипа, который вовлечен в патогенез системной красной волчанки [28];

4. Может участвовать:

1) в феномене усиления ответа M1 макрофагов на провоспалительные стимулы, благодаря конвергенции Notch1-RBP-J-, IFN-γ- и TLR4- путей на уровне IRF8;

2) в феномене сопряжения усиления продукции провоспалительных цитокинов со снижением продукции противовоспалительных цитокинов, благодаря тому, что Notch/RBP-J-зависимое репрограммирование M1 фенотипа макрофагов увеличивает экспрессию SOCS3, ингибитора фактора транскрипции M2 генов STAT3;

3) в феномене каскадной активации, благодаря тому, что TLR4/NF-κB-путь M1 репрограммирования, увеличивает количество Dll4, лигандов Notch-пути M1 репрограммирования.

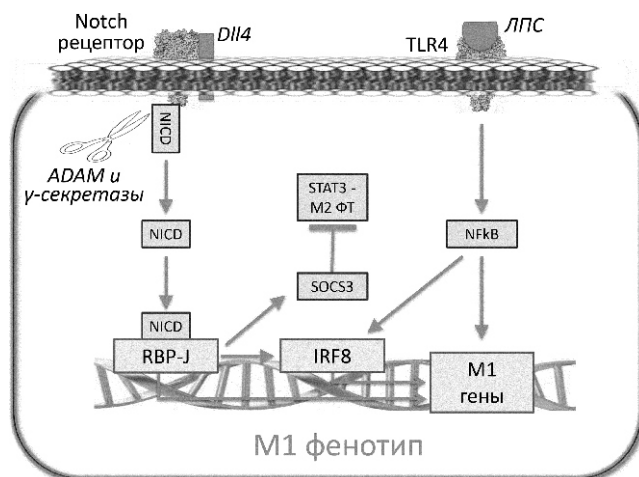


Рис. 3. Notch-сигнальный путь в репрограммировании макрофагов и взаимодействие с TLR-зависимым сигнальным путем. M2 ФТ — фактор транскрипции генов, вовлеченных в формирование M2 фенотипа.



#### 4. JAK/STAT-сигнальный путь в репрограммировании макрофагов

В иммунных клетках JAK/STAT путь передает сигналы от IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 и IL-21 с цитокиновых рецепторов [30]. JAK/STAT-путь использует четыре JAK (just another kinase или Janus kinase) JAK1, JAK2, JAK3, и Tyk2 и семь факторов транскрипции STAT: STAT1-4, 5A, 5B and 6 [31]. Интересно, что лигандами рецепторов JAK/STAT пути могут быть как RF-M1, например, IFN- $\gamma$ , так и RF-M2, например, IL-4 (рис. 4) [31].

IFN- $\gamma$  использует JAK/STAT путь для активации STAT1, который увеличивает продукцию провоспалительных цитокинов и программирует M1 фенотип макрофагов [32] (рис. 4). IFN- $\gamma$ /JAK/STAT1 путь регулируется IRF5 и IRF4 [33]. IRF5 активируется провоспалительными [34], а IRF4 — противовоспалительными факторами [35]. IRF5 усиливает IFN- $\gamma$ /JAK/STAT1-зависимую активацию продукции M1 цитокина IL-12 [36], а IRF4 угнетает активирующее влияние IRF5 [35]. Таким образом IRF4 и IRF5 имеют противоположное влияние на IFN- $\gamma$ /JAK/STAT1 путь и фенотип макрофагов.

IFN- $\gamma$ /JAK/STAT1 путь вовлечен в феномен усиления ответа макрофагов на TLR лиганды после преколонирования с IFN- $\gamma$ . В основе этого феномена лежит конвергенция IFN- $\gamma$ /JAK- и TLR4-сигнальных путей на уровне STAT1 [37]. Поэтому, увеличенная активность STAT1 в IFN- $\gamma$ -репрограммированных макрофагах обеспечивает более интенсивный ответ на последующее действие лигандов TLR4.

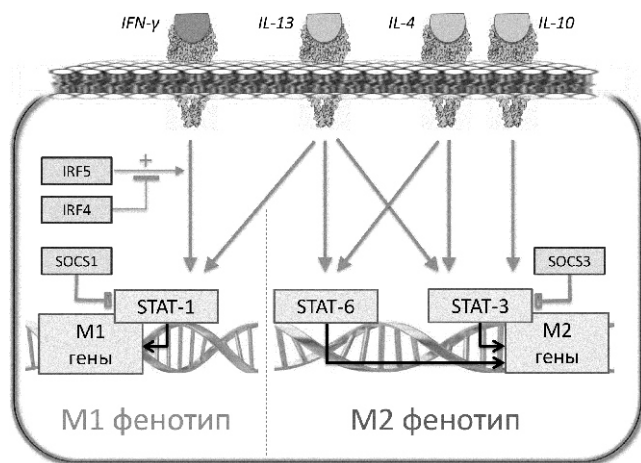


Рис. 4. JAK/STAT-сигнальный путь в репрограммировании макрофагов.

IL-4, IL-13 и IL-10, которые репрограммируют макрофаги на M2 фенотип, также используют JAK/STAT сигнальный путь (рис. 4).

Связывание IL-4 с рецептором приводит к активации JAK, но дальше в отличие от IFN- $\gamma$ , происходит фосфорилирование и активация факторов транскрипции генов M2 фенотипа — STAT3 и STAT6 [38]. В макрофагах IL-4 также индуцирует экспрессию c-Myc, который увеличивает экспрессию генов M2 фенотипа, таких как Scarb1 и Mrc1, а также увеличивает активность STAT6 и PPAR- $\gamma$  [39].

Связывание IL-13 с рецептором активирует JAK1, JAK2 и Tyk2 киназы, с последующей активацией STAT1 (через Tyk2 киназу), STAT3 (через JAK2 киназу) и STAT6 (через Tyk2 киназу) [38]. Дальше STAT3 и STAT6 активируют экспрессию генов M2 фенотипа, таких как гены маннозного рецептора, Fizz1, Ym1 и противовоспалительных цитокинов [40], а STAT1 активирует провоспалительные цитокины (рис. 4). IL-13 является цитокином с хорошо доказанным M2-репрограммирующим действием. Вероятно, суммарный противовоспалительный ответ макрофагов на IL-13 определяется преваляцией активации STAT3 и STAT6 над STAT1. Можно, однако, предположить, что блокирование STAT3 и STAT6 может привести к формированию switch фенотипа макрофага, который на действие противовоспалительного цитокина IL-13 может отвечать продукцией провоспалительных цитокинов.

Связывание IL-10 с рецептором через активацию JAK1 и STAT3 индуцирует экспрессию генов M2 фенотипа, таких, как TGF- $\beta$  и IL-10 [40] и генов, вовлеченных в ингибирование продукции M1 цитокинов, таких, как TNF- $\alpha$  [41]. Кроме того, IL-10 увеличивает транслокацию p50/p50 в ядро, где p50/p50 блокирует экспрессию провоспалительных генов [42].

В конструкции JAK/STAT сигнального пути встроены два важных регулятора перекрестного M1/M2 репрограммирования макрофагов. Это SOCS1 и SOCS3 белки [43]. Так, IL-4 активирует синтез SOCS1, который блокирует STAT1, и таким образом препятствует формированию M1 фенотипа. IFN- $\gamma$  и лиганды TLR4 активируют синтез SOCS3, который блокирует STAT3, и таким образом препятствует формированию M2 фенотипа [44] (рис. 4). При этом, синтез SOCS1 активирует STAT6, фактор транскрипции M2 фенотипа, а синтез SOCS3 — STAT1, фактор транскрипции M1 фенотипа. Такие взаимодействия между SOCS и STAT, дополнительно объясняют механизмы феномена сопряжения увеличения продукции провоспалительных цитокинов со снижением продукции противовоспалительных цитокинов при репрограммировании на M1 фенотип, и наоборот.



Таким образом, JAK/STAT-зависимый сигнальный путь:

1. Обеспечивает реакцию макрофагов на цитокины IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, и IL-21, а также IFN- $\gamma$ .

2. Может транслировать в ядро сигналы как от M1 цитокина IFN- $\gamma$  и через STAT1 репрограммировать макрофаги на M1 фенотип, так и от M2 цитокинов IL-4, IL-10 и IL-13 и через STAT3 и STAT6 репрограммировать на M2 фенотип. Это позволяет макрофагу интегрировать репрограммирующий эффект микроокружения с разными цитокинами.

3. Благодаря наличию M1-репрограммирующего Tyc2/STAT1 пути и M2-репрограммирующих JAK2/STAT3 и Tyc2/STAT6 путей, запускающихся с рецепторов IL-13, JAK/STAT-зависимый сигналинг, вероятно, может формировать switch фенотип, который при угнетении M2-репрограммирующих путей будет в ответ на RF-M2 IL-13 увеличивать продукцию M1 цитокинов и формировать M1 фенотип.

4. Участвует:

1) в феномене усиления провоспалительного ответа макрофагов на разные воспалительные стимулы после репрограммирования, благодаря конвергенции IFN- $\gamma$ /JAK- и TLR4- путей на уровне STAT1;

2) в феномене сопряжения увеличения продукции провоспалительных цитокинов со снижением продукции противовоспалительных цитокинов при программировании M1 фенотипа, и наоборот, благодаря взаимодействиям между SOCS и STAT.

### 5. TGF- $\beta$ -сигнальный путь в репрограммировании макрофагов

TGF- $\beta$  продуцируется фибробластами, макрофагами, лимфоцитами, а также опухолевыми клетками. Семейство секреторных белков TGF- $\beta$  включает TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, активины, факторы роста и дифференцировки и др. Иммунные клетки продуцируют преимущественно TGF- $\beta$ 1.

TGF- $\beta$  передает сигнал в клетку через гетеротетрамерный рецептор, который состоит из двух трансмембранных субъединиц I типа (T $\beta$ RI) и двух II типа (T $\beta$ RII) с цитоплазматическими киназными доменами. В рецепторном комплексе, который образуется после связывания TGF- $\beta$ , T $\beta$ RII аутофосфорилируется и фосфорилирует T $\beta$ RI. В результате киназный домен T $\beta$ RI связывается с факторами транскрипции SMAD2 и SMAD3 (рис. 5). Белок SARA (SMAD Anchor for Receptor Activation) помогает привлечь SMAD2/3 к T $\beta$ RI [45]. После этого T $\beta$ RI фосфорилирует, и таким образом, активирует SMAD2/3. Активированный SMAD2/3 связывает SMAD4 и SMAD2/3/4 комплекс транслируется в ядро.

TGF- $\beta$ -активируемые SMAD-зависимые пути [15] увеличивают активность генов M2 фенотипа, такие, как *arg1* и *mgl2* [46.] и репрограммируют макрофаг в сторону M2 фенотипа.

TGF- $\beta$ -зависимое программирование M2 фенотипа контролирует ингибиторный SMAD7. SMAD7 может связываться с T $\beta$ RI, предупреждая фосфорилирование SMAD2/3 или может индуцировать протеосомальную деградацию SMAD2/3. IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  могут увеличивать экспрессию SMAD7, приводя к ингибированию TGF- $\beta$ /SMAD пути и снижению продукции противовоспалительных цитокинов в ответ на TGF- $\beta$ . Этот механизм помогает понять природу феномена сопряжения усиления продукции провоспалительных цитокинов со снижением продукции противовоспалительных цитокинов.

Кроме SMAD-зависимого пути, TGF- $\beta$  может активировать SMAD-независимые Ras/MAPK/Erk-, PI3K/Akt-, p38- и JNK- и Rho like GTPases- [15] зависимые пути. В SMAD-независимых путях важную роль ретранслятора сигнала от TGF- $\beta$  на активацию MAP киназных путей (JNK, p38) и NF- $\kappa$ B играет белок TAK1 (TGF- $\beta$  activated kinase 1) [47] (рис. 5). Можно предположить, что SMAD-независимые сигнальные пути, которые активирует провоспалительные белки и факторы транскрипции, такие, как JNK, p38 и NF- $\kappa$ B, могут репрограммировать макрофаги на M1 фенотип, особенно в условиях, когда заблокирован SMAD-зависимый путь, например, в результате активации SMAD7.

Таким образом, TGF- $\beta$ -зависимый сигнальный путь:

1. Обеспечивает реакцию макрофагов на лиганды семейства TGF- $\beta$ ;

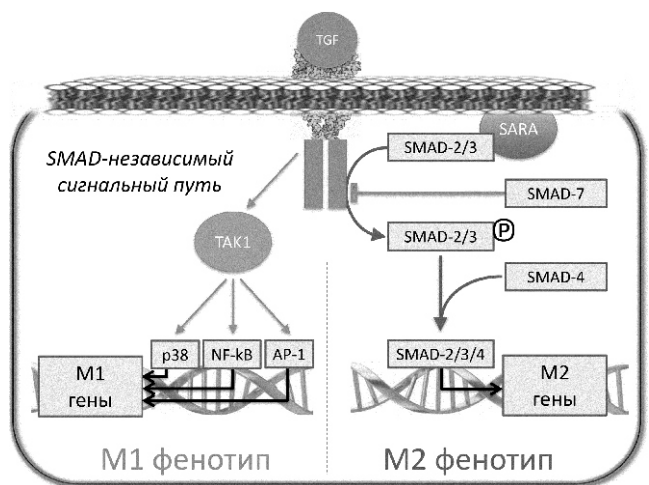


Рис. 5. TGF- $\beta$ -сигнальный путь в репрограммировании макрофагов.

2. Транслирует в ядро сигналы от TGF-β через SMAD2/3/4-зависимый путь и таким образом, репрограммирует макрофаги на M2 фенотип.

3. Благодаря наличию SMAD-независимых путей, TGF-β-зависимый сигналинг, через TAK1/JNK/ρ38/NF-κB, вероятно, может участвовать в формировании switch фенотипа, который при угнетении SMAD-репрограммирующих путей будет в ответ на RF-M2 TGF-β увеличивать продукцию M1 цитокинов и формировать M1 фенотип.

4. Участвует в формировании феномена сопряжения увеличения продукции провоспалительных цитокинов со снижением продукции противовоспалительных цитокинов в M1 фенотипе. Это связано с тем, что программирование M1 фенотипа с помощью IFN-γ или TNF-α повышает экспрессию SMAD7, который блокирует образование SMAD2/3/4 и продукцию противовоспалительных M2 цитокинов.

### 6. TLR/NF-κB-сигнальный путь в репрограммировании макрофагов

Toll-like рецепторы (TLR) относятся к семейству трансмембранных PRR, которые распознают специфические консервативные ПАМПП на молекулах микробов. Связывание ПАМПП с TLR-ами запускает сигнальные каскады, которые индуцируют экспрессию провоспалительных цитокинов. У человека идентифицированы шесть TLR (TLR1, 2, 4, 5, 6 и 10), которые экспрессируются на поверхности макрофагов. Каждый TLR имеет лиганд-чувствительный домен на экстраклеточном N-конце, трансмембранный домен и TIR домен на цитоплазматическом C-конце [48].

После связывания лиганда TLR формируют димеры или меняют свою конформацию. В результате происходит сближение TIR доменов, и они начинают

взаимодействовать с разными адапторными белками, и прежде всего с MyD88 (myeloid differentiation primary-response gene 88) [49]. В TLR-индуцированных путях, MyD88 связывается с членами IRAK (IL-1R associated kinase) семейства с образованием олигомерного комплекса Myddosome [50] (рис. 6). В Myddosome происходит фосфорилирование IRAK. Далее фосфорилированные IRAK привлекают к мембране TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor-6) [51], а TRAF6 привлекает комплекс TAK1.

ТАК проводит сигналы от TLR и рецепторов TGF-β, TNF-α и IL-1 [47]. Конвергенция сигналов на TAK от про- (TNF-α) и противовоспалительных (TGF-β) цитокинов, означает, что в макрофагах заложена возможность в ответ на провоспалительные факторы (RF-M1), например, TNF-α отвечать продукцией противовоспалительных цитокинов, и наоборот, в ответ на противовоспалительные факторы (RF-M2), например, TGF-β отвечать продукцией провоспалительных цитокинов. Очевидно, что в первом случае, этот механизм поможет ограничить избыточное воспаление, а во втором — предупредить критическое снижение свойств макрофагов при развитии Th2 ответа. И в том и другом случае, можно говорить, что TAK может формировать switch фенотип макрофагов.

Привлечение комплексов TAK к TRAF6 сопровождается сближением киназных доменов TAK друг к другу. Это вызывает аутофосфорилирование и активацию TAK1 киназы, которая в свою очередь активирует молекулярный комплекс, содержащий IκB киназу (IKK) [52] (рис. 6)

IKK комплекс состоит из двух каталитических субъединиц, IKKα и IKKβ и регуляторной субъединицы, NEMO (IKKγ) [52]. IKK фосфорилирует ингибиторную субъединицу IκB, которая связана с фактором транскрипции NF-κB в цитоплазме неактивного макрофага. Фосфорилирование IκB приводит к его деградации в протеосомах. В результате высвобождается NF-κB [53]. Свободный NF-κB транспортируется в ядро, где он активирует транскрипцию генов, вовлеченных в воспаление, иммунные ответы и клеточный рост [53]. Провоспалительные цитокины, продуцируемые NF-κB-зависимым образом, могут повторно активировать NF-κB-зависимый путь. Так формируется положительная обратная связь, которая может обеспечить быстрое формирование провоспалительного фенотипа. NF-κB также активирует гены IκB. Этот механизм ограничивает чрезмерное вхождение NF-κB в ядро и представляет собой классический механизм отрицательной обратной связи, который предупреждает чрезмерное воспаление.

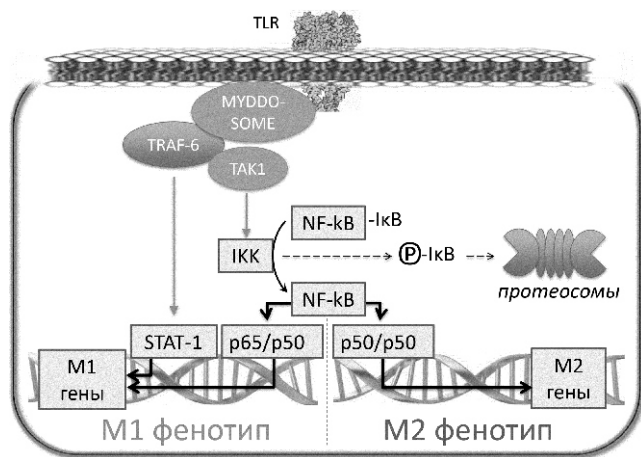


Рис. 6. TLR/NF-κB-сигнальный путь в репрограммировании макрофагов.

Семейство факторов транскрипции NF-κB объединяет несколько белков. RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 (p105 precursor), p52 (p100 precursor) и Relish. RelA (p65), RelB, и c-Rel могут, а p50 (p105 precursor), p52 (p100 precursor), и Relish не могут активировать экспрессию провоспалительных генов.

TLR/NF-κB сигналинг играет ключевую роль репрограммировании макрофагов в ответ на микробную инвазию. TLR/NF-κB сигналинг преимущественно вовлечен в M1- репрограммирование макрофагов. В TLR/NF-κB-зависимом репрограммировании интересны и важны три момента.

Во-первых, при ЛПС-зависимом репрограммировании макрофагов на M1 фенотип активация NF-κB происходит в форме p65/p50. p65/p50 увеличивает продукцию провоспалительных цитокинов. Одновременно ЛПС увеличивает экспрессию генов ядерных IκBζ [54]. IκBζ блокирует p50/p50 форму NF-κB, которая стимулирует продукцию противовоспалительных цитокинов [55]. Это пример еще одного механизма феномена сопряжения усиления продукции провоспалительных цитокинов со снижением продукции противовоспалительных цитокинов в M1 фенотипе.

Во-вторых, TLR/NF-κB путь за счет изменения субъединичного состава NF-κB может переключать репрограммирование фенотипа. Если в результате связывания лигандов с TLR, активация NF-κB происходит в форме p50/p65, то увеличивается продукция провоспалительных медиаторов [56] и формируется M1 фенотип макрофагов. Если активация NF-κB происходит в форме p50/p50, то формируется M2 фенотип, как это происходит, в опухолево-ассоциированных макрофагах и ЛПС-толерантных макрофагах [55]. По сути это один из важных механизмов пластичности макрофагов, который позволяет быстро реагировать на изменившуюся инфекцию и микроокружение. Возможность переключения между образованием p50/p50 (фактор транскрипции M2 генов) и p65/p50 (фактор транскрипции M1 генов) в ответ на действие одного и того же лиганда — ЛПС, который является RF-M1, означает возможность формирования switch фенотипа макрофагов, который в ответ на действие RF-M1 (ЛПС) будет продуцировать противовоспалительные факторы и формировать M2 фенотип.

В-третьих, выяснилось, что связывание ЛПС к TLR4 индуцирует фосфорилирование фактора транскрипции STAT1 [57]. Эти данные означают, что в TLR-зависимом репрограммировании макрофагов STAT1 может играть важную роль. Было показано, что фосфорилирование STAT1 зависило от MyD88 и TRAF6, но не зависило от IRF-3, IRF7 и

рецепторов IFN-γ. Это означало, что активация STAT1 связана с TLR сигналингом, а не опосредуется аутокринной активацией через IFN-γ [57]. После активации, STAT1 транслоцируется в ядро и активирует провоспалительные гены, такие, как TNF-α.

Эти результаты демонстрируют возможность передачи сигнала между сигнальными путями, в данном случае с TLR- на STAT-зависимый путь через TRAF6 на активацию STAT1. Этот механизм отражает феномен каскадной активации путей репрограммирования макрофагов и может участвовать в феномене усиления продукции провоспалительных цитокинов после репрограммирования на M1 фенотип, например, в усилении продукции TNF-α в ответ на лиганды JAK/STAT-пути после TLR-зависимого репрограммирования.

Таким образом, TLR-зависимый сигнальный путь:

1. Обеспечивает реакцию и репрограммирование макрофагов на лиганды TLR разнообразные ПАМПС;

2. Транслирует в ядро сигналы через факторы транскрипции NF-κB и STAT1 и таким образом, увеличивает продукцию провоспалительных генов и репрограммирует макрофаги на M1 фенотип;

3. Благодаря возможности формирования NF-κB в разной форме, p65/p50 — провоспалительной M1, или p50/p50 — противовоспалительной M2, TLR-зависимый путь, может программировать switch фенотип, который будет в ответ на RF-M1, например, ЛПС, увеличивать продукцию M2 цитокинов;

4. Участвует в формировании феноменов репрограммирования. Во-первых, в феномене сопряжения увеличения продукции провоспалительных цитокинов со снижением продукции противовоспалительных цитокинов в M1 фенотипе. Это связано с тем, что репрограммирование M1 фенотипа с помощью ЛПС усиливает экспрессию ядерных IκBζ, которые блокируют p50/p50 противовоспалительную форму NF-κB. Во-вторых, в феномене усиления продукции провоспалительных цитокинов на лиганды JAK/STAT-пути после TLR-зависимого программирования M1 фенотипа. В основе феномена лежит активация фактора транскрипции JAK/STAT-пути, STAT1 с TLR, в-третьих, в феномене каскадной активации путей репрограммирования, благодаря передаче сигнала с TLR-зависимого пути на STAT-зависимый путь через TRAF6 и в-четвертых, в феномене положительных и отрицательных обратных связей, благодаря возможности провоспалительных цитокинов повторно активировать NF-κB и благодаря NF-κB-зависимому синтезу ингибитора IκB соответственно.



7. Гипоксия-зависимый путь в репрограммировании макрофагов

Ключевую роль в гипоксическом репрограммировании фенотипа макрофагов играет внутриклеточный белковый комплекс сенсора кислорода [58]. Функцию такого сенсора выполняет молекулярный комплекс, состоящий из кислородо-чувствительного фермента пролил-4-гидроксилазы PHD (prolyl-4-hydroxylase domain enzymes) и гипоксического фактора транскрипции HIF (hypoxia-inducible factor). HIF состоит из двух субъединиц: конститутивной HIF-β и кислородо-чувствительной HIF-1α, -2α или -3α. При нормальном содержании кислорода HIF-β постоянно присутствует в клетке. HIF-α постоянно синтезируется, но не накапливается, потому что в условиях нормоксии, к HIF-α с помощью PHD присоединяется гидроксильная группа [59] и такой HIF-α попадает в протеасомы и расщепляется.

В условиях гипоксии, активность PHD снижается. В результате HIF-α накапливается, соединяется с HIF-β и образует HIF-α/HIF-β димер, активную форму фактора транскрипции генов. Этот димер проникает в ядро и активирует гены [58], которые повышают устойчивость макрофагов к гипоксии и репрограммируют его фенотип.

В макрофагах в зависимости от степени гипоксии происходит активация или HIF-1α или HIF-2α. HIF-1α активирует синтез индуцибельной NOS и способствует формированию M1 фенотипа, тогда как HIF-2α активирует аргиназу 1 и способствует формированию M2 фенотипа [60, 61].

Таким образом, гипоксия-зависимый сигнальный путь в зависимости от интенсивности гипоксии, транслирует сигналы в ядро или через HIF-1α, или через HIF-2α. HIF-1α способствует формированию M1 фенотипа, тогда как HIF-2α — M2 фенотипа макрофагов.

**Заключение.**

**Ключевые положения и выводы о сигнальных механизмах репрограммирования макрофагов**

1. Существует относительная специализация сигнальных путей в репрограммировании макрофагов на действие разных компонентов микроокружения. Так,

- факторы роста, жирные кислоты и лиганды рецепторов, сопряженных с G белками, репрограммирует макрофаги с помощью JNK-зависимого пути,
- микробная инвазия, и более конкретно ПАМП, репрограммирует макрофаги, с помощью TLR-, PI3K/Akt- и Notch-зависимых путей,

- изменение на клетках в микроокружении содержания Delta-like и JAG лигандов репрограммирует макрофаги с помощью Notch-зависимых путей,

- изменение цитокинового микроокружения репрограммирует макрофаги с помощью JNK-, PI3K/Akt- и JAK/STAT-зависимых сигнальных путей,

- изменение содержания TGF-β в микроокружении репрограммирует макрофаги с помощью SMAD-зависимых и SMAD-независимых путей,

- изменение содержания кислорода в микроокружении репрограммирует макрофаги с помощью гипоксия/HIF-зависимых путей.

2. Сигнальные пути, которые вовлечены в репрограммирование макрофагов можно разделить на две группы: пути, которые преимущественно программируют M1 фенотип, такие, как JNK-, Notch-,

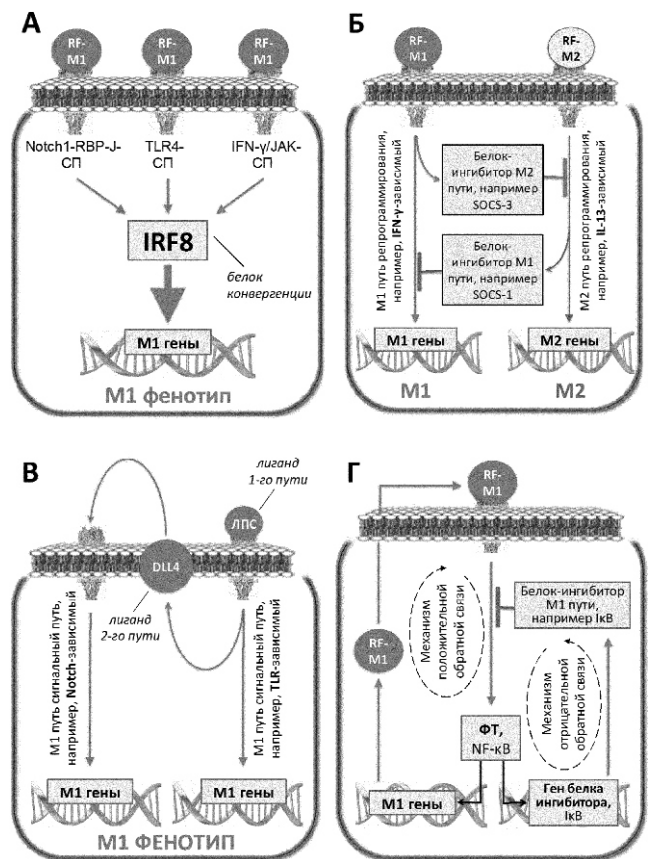


Рис. 7. Основные феномены репрограммирования макрофагов: А — феномен усиления ответа макрофагов как на репрограммирующий фактор (прямое усиление), так и на другой фактор (перекрестное усиление); Б — феномен реципрокного подавления альтернативного фенотипа; В — феномен каскадной активации механизмов репрограммирования; Г — феномен положительных и обратных связей в механизмах репрограммирования.



TLR/NF-κB(ρ65/ρ50)-, ρ13K/Akt2-, JAK/STAT1- и HIF1α- пути и пути, которые преимущественно программируют M2 фенотип, такие, как ρ13K/Akt1-, JAK/STAT3/6-, TGF-β/SMAD-, TLR/NF-κB(ρ50/ρ50) и HIF2α- пути.

3. Понимание механизмов репрограммирования позволяет объяснить четыре главных феномена репрограммирования.

В основе феномена усиления ответа репрограммированных макрофагов на фактор, с помощью которого репрограммируется макрофаг (прямое усиление) или на другой фактор (перекрестное усиление), лежит конвергенция сигнальных путей (рис. 7,А) на уровне определенного белка. Поэтому предварительное репрограммирование макрофагов с помощью одного сигнального пути, которое увеличивает активность или содержание этого белка усиливает ответ макрофагов на лиганды другого сигнального пути. Для M1-репрограммирующих Notch1-RBP-J-, IFN-γ- и TLR4- путей таким белком конвергенции является белок IRF8, для IFN-γ/JAK- и TLR4- путей — STAT1.

В основе феномена реципрокного подавления альтернативного фенотипа макрофагов лежит то, что формирование одного фенотипа сопровождается усилением синтеза молекул, которые подавляют формирования альтернативного фенотипа (рис. 7,Б). Так, при программировании M1 фенотипа с помощью:

- 1) Notch/RBP-J-пути увеличивается экспрессия SOCS3, который подавляет активность фактора транскрипции M2 генов STAT3;
- 2) IFN-γ- и TLR4 путей увеличивается синтез SOCS3, который блокирует фактор транскрипции M2 генов STAT3;
- 3) IFN-γ- и TNF-α путей усиливается экспрессия SMAD7, который блокирует активацию фактора транскрипции M2 генов SMAD2/3/4;
- 4) TLR/NF-κB(ρ65/ρ50) пути усиливается экспрессия ингибиторов, которые блокируют активацию M2 генов.

При программировании M2 фенотипа с помощью IL-4/JAK/STAT пути увеличивается синтез SOCS1, который блокирует фактор транскрипции M1 генов STAT1.

В основе феномена каскадной активации сигнальных путей репрограммирования лежит способность одного пути передавать сигналы на другой путь. Так ЛПС/TLR4/NF-κB- путь M1 репрограммирования увеличивает также количество Dll4, лигандов Notch другого пути M1 репрограммирования, TLR-зависимый путь через TRAF6 передает сигнал на STAT-зависимый путь (рис. 7,В).

В основе феномена положительных и отрицательных обратных связей лежит способность сигнального пути увеличивать синтез как активаторов этого пути, так и ин-

гибиторов. Так, NF-κB-зависимый путь M1 репрограммирования увеличивает количество провоспалительных цитокинов, которые активируют этот путь и таким образом формируют положительную обратную связь, так и IκB, который ингибирует NF-κB и таким образом формируют отрицательную обратную связь (рис. 7,Г).

Эти феномены обеспечивают, с одной стороны, быстрое формирование M1 макрофагов при необходимости обезвредить бактерии или вирусы или M2 макрофагов при необходимости уничтожить паразитов, усилить ангиогенез и репарировать ткань, а с другой стороны — предупреждают избыточную активацию того или иного фенотипа.

4. Сигнальные пути, которые передают сигнал от RF-M1 и программируют провоспалительный M1 фенотип макрофагов, часто имеют ответвление, которое при его активации может увеличить продукцию противовоспалительных M2 цитокинов; и наоборот. Так JNK-зависимые пути активируют факторы транскрипции M1 фенотипа, но могут активировать и фактор транскрипции M2 генов — SMAD3; ρ13K/Akt-зависимый путь через Akt2 программирует M1 фенотип, а через Akt1 — M2; Notch путь через NICD/RBP-J/IRF8 увеличивает продукцию M1 цитокинов, а через ρ13K-/MAPK-/NF-κBρ50 — продукцию M2 цитокинов; IL-13 через JAK2/STAT3- и Tyc2/STAT6- пути формирует M2 фенотип, а через Tyc2/STAT1 путь M1 фенотип; TGF-β через SARA/SMAD2/3/4-зависимый путь программирует M2 фенотип макрофагов, а через TAK1/JNK/ρ38/NF-κB может программировать M1 фенотип и наконец, TLR-зависимый путь через ρ65/ρ50 программирует M1, а через ρ50/ρ50 — M2 фенотип.

Биологический смысл такой конструкции сигнальных путей в том, чтобы предупредить избыточное воспаление и повреждение тканей при формировании M1 фенотипа (при необходимости уничтожить вирус или бактерию) или предупредить значительное снижение

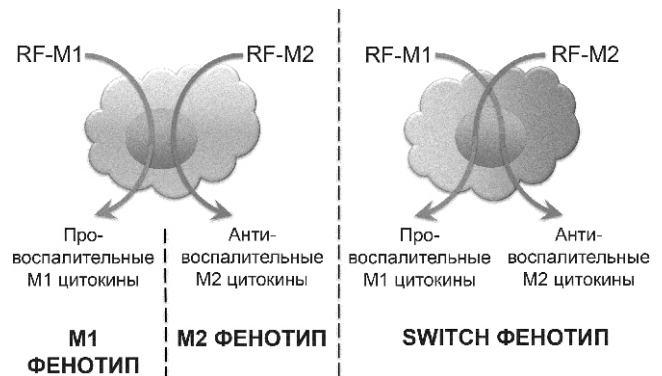


Рис. 8. Схематическое представление M1 и M2 фенотипа макрофагов и фенотипа переключения («switch»).

бактерицидной активности макрофагов и возможность развития аутомунных процессов при формировании M2 фенотипа (при необходимости уничтожить внеклеточных паразитов). Фенотип макрофага, который на провоспалительный RF-M1 отвечает продукцией противовоспалительных медиаторов, или на противовоспалительные RF-M2 отвечает продукцией провоспалительных медиаторов можно назвать как фенотип «переключения» или как «switch» фенотип (рис. 8).

5. Поскольку нарушение репрограммирования макрофагов играет важную роль в развитии многих заболеваний, детальное понимание ключевых звеньев, белков, ферментов механизма репрограммирования, несомненно, окажет помощь в выборе эффективных терапевтических мишеней при разработке новых способов коррекции нарушенного иммунитета.

Обзор написан при финансовой поддержке Минобрнауки России (Соглашение от 17 июня 2014 г. №14.604.21.0020, Уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEF160414X0020).

## References

1. Benoit M., Desnues B., Mege J.L. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol.* 2008; 181 (6): 3733-9.
2. Malyshev I., Manukhina E., Malyshev Y. Physiological organization of immune response based on the homeostatic mechanism of matrix reprogramming: implication in tumor and biotechnology. *Med Hypotheses.* 2014; 82 (6): 754-65.
3. Mantovani A., Sica A., Locati A. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol.* 2007; 37 (1): 14-6.
4. Falcone F.H., Haas H., Gibbs B.F. The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood.* 2000; 96 (13): 4028-38.
5. D'Andrea A., Aste-Amezaga M., Valiante N.M., Ma X., Kubin M., Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med.* 1993; 178 (3): 1041-8.
6. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000; 164 (12): 6166-73.
7. Sica A., Martinez F.O., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008; 13: 453-61.
8. Sieling P.A., Abrams J.S., Yamamura M., Salgame P., Bloom B.R., Rea T.H., Modlin R.L. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. *J Immunol.* 1993; 150 (12): 5501-10.
9. Noël W., Raes G., Hassanzadeh Ghassabeh G., De Baetselier P., Beschin A. Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends Parasitol.* 2004 Mar;20(3):126-33.
10. Mantovani A., Biswas S.K., Galdiero M.R., Sica A., Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling. *J Pathol.* 2013; 229 (2): 176-85.
11. Melgert B.N., ten Hacken N.H., Rutgers B., Timens W., Postma D.S., Hylkema M.N. More alternative activation of macrophages in lungs of asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2011; 127 (3): 831-3.
12. Chanmee T., Ontong P., Konno K., Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel).* 2014; 13; 6 (3):1670-90.
13. Zhou D., Huang C., Lin Z., Zhan S., Kong L., Fang C. et al. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signal.* 2014; 26 (2): 192-7.
14. Weisberg S.P., McCann D., Desai M., Rosenbaum M., Leibel R.L., Ferrante A.W. Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003; 112 (12): 1796-808.
15. Derynck R., Zhang Y.E. SMAD-dependent and SMAD-independent pathways in TGF-beta family signaling. *Nature.* 2003; 425 (6958): 577-84.
16. Kang K., Reilly S.M., Karabacak V., Gangl M.R., Fitzgerald K., Hatano B. et al. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 2008; 7 (6): 485-95.
17. Luyendyk J.P., Schabbauer G.A., Tencati M., Holscher T., Pawlinski R., Mackman N. Genetic analysis of the role of the PI3K-Akt pathway in lipopolysaccharide-induced cytokine and tissue factor gene expression in monocytes/macrophages. *J Immunol.* 2008; 180 (6): 4218-26.
18. Arranz A., Doxaki C., Vergadi E., Martinez de la Torre Y., Vaporidi K., Lagoudaki E.D. et al. Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109 (24): 9517-22.
19. Xu F., Kang Y., Zhang H., Piao Z., Yin H., Diao R. et al. Akt1-mediated regulation of macrophage polarization in a murine model of Staphylococcus aureus pulmonary infection. *J Infect Dis.* 2013; 208 (3): 528-38.
20. Androulidaki A., Iliopoulos D., Arranz A., Doxaki C., Schworer S., Zacharioudaki V. et al. The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity.* 2009; 21; 31 (2): 220-31.
21. Ruffell D., Mourkioti F., Gambardella A., Kirstetter P., Lopez R.G., Rosenthal N. et al. A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106 (41):17475-80.
22. D'Souza B., Miyamoto A., Weinmaster G. The many facets of Notch ligands. *Oncogene.* 2008; 27 (38): 5148-67.
23. Xu H., Zhu J., Smith S., Foldi J., Zhao B., Chung A.Y. et al. Notch-RBP-J signaling regulates the transcription factor IRF8 to promote inflammatory macrophage polarization. *Nat Immunol.* 2012; 13 (7): 642-50.
24. Fung E., Tang S.M., Canner J.P., Morishige K., Arboleda-Velasquez J.F., Cardoso A.A. et al. Delta-like 4 induces notch signaling in macrophages: implications for inflammation. *Circulation.* 2007; 115 (23): 2948-56.
25. Liu J., Guan X., Tamura T., Ozato K., Ma X. Synergistic activation of interleukin-12 p35 gene transcription by interferon regulatory factor-1 and interferon consensus sequence-binding protein. *J Biol Chem.* 2004; 279 (53): 55609-17.
26. Zhao J., Kong H.J., Li H., Huang B., Yang M., Zhu C. et al. IRF-8/interferon (IFN) consensus sequence-binding protein is involved in Toll-like receptor (TLR) signaling and contributes to the cross-talk between TLR and IFN-gamma signaling pathways. *J Biol Chem.* 2006; 281 (15): 10073-80.
27. Wang Y.C., He F., Feng F., Liu X.W., Dong G.Y., Qin H.Y. et al. Notch signaling determines the M1 versus M2

- polarization of macrophages in antitumor immune responses. *Cancer Res.* 2010; 70 (12): 4840-9.
28. Zhang W., Xu W., Xiong S. Blockade of Notch1 signaling alleviates murine lupus via blunting macrophage activation and M2b polarization. *J Immunol.* 2010; 184 (11): 6465-78.
29. Kono Y., Kawakami S., Higuchi Y., Yamashita F., Hashida M. In vitro evaluation of inhibitory effect of nuclear factor-kappaB activity by small interfering RNA on pro-tumor characteristics of M2-like macrophages. *Biol Pharm Bull.* 2014; 37 (1): 137-44.
30. Schindler C., Levy D.E., Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem.* 2007; 282 (28): 20059-63.
31. Murray P.J. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol.* 2007; 178 (5): 2623-9.
32. Yeh C.H., Shih H.C., Hong H.M., Lee S.S., Yang M.L., Chen C.J. et al. Protective effect of wogonin on proinflammatory cytokine generation via Jak1/3-STAT1/3 pathway in lipopolysaccharide stimulated BV2 microglial cells. *Toxicol Ind Health.* 2013; Available at: <http://tih.sagepub.com/content/early/2013/04/16/0748233713485886.long>.
33. Satoh T., Kidoya H., Naito H., Yamamoto M., Take-mura N., Nakagawa K. et al. Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages. *Nature.* 2013; 495 (7442): 524-8.
34. Seneviratne A., Cole J., Goddard M., Udalova I., Krams R., Monaco C. M1 macrophages and irf5 exacerbate atherosclerotic disease. *Heart.* 2013; 99: A103.
35. Eguchi J., Kong X., Tenta M., Wang X., Kang S., Rosen E.D. Interferon regulatory factor 4 regulates obesity-induced inflammation through regulation of adipose tissue macrophage polarization. *Diabetes.* 2013; 62 (10): 3394-403.
36. Krausgruber T., Blazek K., Smallie T., Alzabin S., Lockstone H., Sahgal N. et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol.* 2011; 12 (3): 231-8.
37. Hu X., Herrero C., Li W.P., Antoniv T.T., Falck-Pedersen E., Koch A.E. et al. Sensitization of IFN-gamma Jak-STAT signaling during macrophage activation. *Nat Immunol.* 2002; 3 (9): 859-66.
38. Bhattacharjee A., Shukla M., Yakubenko V.P., Mulya A., Kundu S., Cathcart M.K. IL-4 and IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages. *Free Radic Biol Med.* 2013; 54: 1-16.
39. Pello O.M., De Pizzol M., Mirolo M., Soucek L., Zammataro L., Amabile A. et al. Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology. *Blood.* 2012; 119 (2): 411-21.
40. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3 (1): 23-35.
41. Riley J.K., Takeda K., Akira S., Schreiber R.D. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem.* 1999; 274 (23): 16513-21.
42. Driessler F., Venstrom K., Sabat R., Asadullah K., Schottelius A.J. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol.* 2004; 135 (1): 64-73.
43. Croker B.A., Kiu H., Nicholson S.E. SOCS3 regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol.* 2008; 19 (4): 414-22.
44. Qin H., Holdbrooks A.T., Liu Y., Reynolds S.L., Yanagisawa L.L., Benveniste E.N. SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation. *J Immunol.* 2012; 189 (7): 3439-48.
45. Massague J., Seoane J., Wotton D. SMAD transcription factors. *Genes Dev.* 2005; 19 (23): 2783-810.
46. Raes G., Brys L., Dahal B.K., Brandt J., Grooten J., Brombacher F. et al. Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol.* 2005; 77 (3): 321-7.
47. Landstrom M. The TAK1-TRAF6 signalling pathway. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42 (5): 585-9.
48. Takeda K., Kaisho T., Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 335-76.
49. O'Neill L.A.J., Bowie A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7 (5): 353-64.
50. Motshwene P.G., Moncrieffe M.C., Grossmann J.G., Kao C., Ayaluru M., Sandercock A.M. et al. An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4. *J Biol Chem.* 2002; 277 (37): 25404-11.
51. Ye H., Arron J.R., Lamothe B., Cirilli M., Kobayashi T., Shevde N.K. et al. Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature.* 2002; 418 (6896): 443-7.
52. Woronicz J.D., Gao X., Cao Z., Rothe M., Goeddel D.V. IκB kinase-β: NF-κB activation and complex formation with IκB kinase-α and NIK. *Science.* 1997; 278 (5339): 866-9.
53. Napetschnig J., Wu H. Molecular Basis of NF-κB Signaling. *Annu Rev Biophys.* 2013; 42: 443-68.
54. Kitamura H., Kanehira K., Okita K., Morimatsu M., Saito M. MAIL, a novel nuclear IκB protein that potentiates LPS-induced IL-6 production. *FEBS Lett.* 2000; 485 (1): 53-6.
55. Porta C., Rimoldi M., Raes G., Brys L., Ghezzi P., Di Liberto D. et al. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 NF-κB. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106 (35): 14978-83.
56. Bonizzi G., Karin M. The two NF-κB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004; 25 (6): 280-8.
57. Luu K., Greenhill C.J., Majoros A., Decker T., Jenkins B.J., Mansell A. STAT1 plays a role in TLR signal transduction and inflammatory responses. *Immunol Cell Biol.* 2014; 92 (9): 761-9.
58. Semenza G.L. Review Oxygen homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2010; 2 (3): 336-61.
59. Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M. et al. HIF1α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science.* 2001; 292 (5516): 464-8.
60. Takeda N., O'Dea E.L., Doedens A., Kim J.W., Weidemann A., Stockmann C. et al. Differential activation and antagonistic function of HIF-1α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev.* 2010; 24 (5): 491-501.
61. Malyshev I.Yu. Hypoxia and reprogramming the immune response in the central role of the macrophages tumors: *Patogenez.* 2011;3: 44-5. (in Russian)

Received 06.04.15



Романова Г.А.<sup>1</sup>, Шакова Ф.М.<sup>1</sup>, Парфёнов А.Л.<sup>2</sup>

## Моделирование черепно-мозговой травмы

<sup>1</sup> — ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, Балтийская ул., 8

<sup>2</sup> — ФГБНУ «Госпиталь для incurable больных — лечебно-реабилитационный центр», 109028, Москва, ул. Солянка, 14, стр. 3

*Обзор современной литературы по экспериментальному моделированию черепно-мозговой травмы (ЧМТ). Даны характеристики различных экспериментальных методов создания моделей ЧМТ. Представляется наиболее адекватной — ударная очаговая модель, позволяющая выявить зависимость степени повреждения коры головного мозга крыс от силы травмирующего воздействия.*

**Ключевые слова:** черепно-мозговая травма, типы моделей, ударная модель, крысы

Romanova G.A.<sup>1</sup>, Shakova F.M.<sup>1</sup>, Parphenov A.L.<sup>2</sup>

## Modeling of traumatic brain injury

<sup>1</sup> — FGBNU NII General pathology and pathophysiology, Moscow, 125315, Baltijskaya str., 8

<sup>2</sup> — FSBI «Hospital for Incurable Patient — the Scientific Medical and Rehabilitation Center», Solijnka str., 14, bild. 3, Moscow

*Contemporary approaches to experimental traumatic brain injury modeling, the principles of functioning and technical characteristics of appropriate equipment are reviewed. The methods describing traumatic brain injury modeling and assessment of brain structural and functional changes caused by the weight drop method are given.*

**Key words:** modeling of experimental traumatic brain injury, pattern of models, weight drop method, rats

Проблема диагностики и эффективного лечения черепно-мозговой травмы (ЧМТ) является одной из важнейших в современной медицинской науке. В последние десятилетия происходит широкое распространение ЧМТ в связи с повышением темпа жизни, увеличением количества скоростных транспортных средств, индустриализацией, а также такими явлениями, как терроризм, локальные военные конфликты. По данным статистики в мире ежегодно погибают вследствие ЧМТ около 5 млн чел. Смертность от ЧМТ составляет 26—82%. ЧМТ — главная причина гибели и нетрудоспособности в посттравматический период для людей моложе 50 лет, причем мужчины страдают в 2,5 раза чаще, чем женщины. ЧМТ приводит к тяжелой инвалидизации и значительному снижению качества жизни [1—3].

Степень этих нарушений определяется характером травматического воздействия на мозг и могут привести к временному или постоянному ухудшению познавательного, физического и психосоциологического состояния. ЧМТ — сложная травматическая болезнь, которая наносит структурный ущерб и вызывает функциональные дефициты, происходящие как из-за основного механического, так и вторичного результата непосредственного разрушения мозговой ткани. ЧМТ происходит во время воздействия внешней силы и включает контузию, по-

вреждение кровеносных сосудов (кровоизлияние), нервных клеток и аксональных отростков нейронов. Вторичное повреждение развивается за минуты и спустя месяцы после первичной травмы в результате каскадов метаболических, клеточных и молекулярных событий, которые в конечном счете приводят как к двигательным, так и неврологическим и когнитивным расстройствам. ЧМТ инициирует каскад патохимических, патофизиологических изменений в головном мозге, что объективно регистрируется нарушением нейрометаболических и морфофункциональных параметров. Особенности этих реакций определяют многообразие клинических проявлений ЧМТ и их динамику. Патофизиологическая разнородность, наблюдаемая у пациентов с ЧМТ, может проявляться как результат локализации, вида, серьезности первичной травмы и определяться существующими ранее факторами, включая состояние исходного здоровья, пол, лечение, употребление алкоголя и наркотиков а также генетическими особенностями пациента.

Низкая эффективность лечения ЧМТ в значительной степени обусловлена недостаточным пониманием патогенеза данной патологии и недостатком адекватных экспериментальных моделей для оценки эффективности новых терапевтических стратегий.

Модели ЧМТ разработаны на животных так, чтобы произвести относительно гомологичный тип первичного повреждения [4—6]. Недостаточная характеристика неврологического дефицита осложняет сравнительную оценку неврологических расстройств в различных моде-

**Для корреспонденции:** Романова Галина Александровна, д.биол.н., проф., гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, ФГБНУ НИИ ОПГ; e-mail: Romanovaga@mail.ru



лях. Таким образом, любая экспериментальная модель не может полностью отразить все аспекты вторичного повреждения при ЧМТ у человека. Несомненно, моделирование ЧМТ у животных важно для изучения биомеханических, клеточных и молекулярных аспектов ЧМТ, которые не могут быть исследованы при лечении травматической болезни человека, но необходимы при разработке новых терапевтических стратегий.

Новые и уже существующие модели ЧМТ должны быть созданы для заполнения терапевтического окна между доклиническими исследованиями и адекватным медицинским лечением, а также прогнозированием спонтанного восстановления.

Любая модель ЧМТ должна отвечать ряду критериев [2, 3, 6]: точная локализация повреждения и строго определенная тяжесть травмы, которая должна соответствовать прилагаемой к черепу животного (закрывающая — ЗЧМТ) или непосредственно к головному мозгу (открывающая — ОЧМТ) механической силе и пропорционально возрастать при её увеличении. Вместе с тем моделирование тяжелого неврологического дефицита всегда связано с высоким показателем гибели животных.

ЧМТ возникает вследствие удара по голове движущимся объектом или столкновения головы с неподвижным препятствием, обуславливающим смещение головного мозга внутри черепа. В большинстве моделей ЧМТ механическое воздействие на головной мозг животного предусматривает однородность степени повреждения и контроль за возникшими функциональными нарушениями для получения репрезентативных результатов.

В настоящее время разработаны и используются несколько различных моделей ЧМТ в эксперименте: жидкостно-перкуSSIONная травма мозга, модель контролируемого коркового повреждения, модель ЧМТ в результате падения груза, модель ударного ускорения. Предложено [2, 3, 5—9] классифицировать модели ЧМТ в зависимости от способа воздействия на головной мозг: ударные, инерционные и с непосредственной деформацией мозга. Принципиальное значение имеет выбор области коры для создания ЧМТ.

*Ударные модели* [2, 3, 5, 6, 9, 10] предусматривают непосредственный удар по голове животного свободно падающим грузом с различными пружинными устройствами или калиброванным маятником. При этом происходит локальная деформация головного мозга от удара. В этих моделях голова животного может быть жестко фиксирована или нет, и в зависимости от этого морфофункциональные последствия значительно различаются.

Наиболее распространенной моделью ЧМТ считают ударную модель, при которой удар по фиксированной голове животного осуществляется *свободно падающим грузом (weight drop method)*. ЧМТ наносят под общей анестезией, после разреза скальпа и обнажения поверхности черепа. Такая модель предполагает воздействие

твердым ударником непосредственно по черепу крысы (ЗЧМТ) [9—13] или через окно в черепе на твердую мозговую оболочку (ОЧМТ) [14—17]. При таких способах моделирования ЧМТ, у грызунов выявляют различные повреждения мозга: от легких, моделирующих сотрясение головного мозга, до очаговых ушибов (в месте падения груза на череп), сопровождающихся вторичной гибелью нервных клеток в отдаленные сроки. Также при этом отмечаются нарушения двигательной и когнитивной функций. Модель травмы головного мозга с помощью падающего груза позволяет исследовать изменения двигательной функции, таким образом, относительно просто создать локальное повреждение моторной коры головного мозга и оценить двигательную функцию задних конечностей в экспериментах с тестированием дисфункции у крыс.

*Жидкостно-перкуSSIONная модель (FPI)* — одна из широко используемых экспериментальных моделей на крысах [18, 19]. При этом виде травмирования мозга происходит комбинированное воздействие — контузия коры и диффузное подкорковое повреждение (гиппокамп и таламус), которое возникает в течение первых минут после воздействия и приводит к повреждению и гибели нейронов в коре уже через 12 часов, а через 7 дней повреждения и далее область травмы увеличивается, развиваются прогрессивные дегенеративные процессы в наиболее уязвимых отделах головного мозга, что приводит к поведенческим и когнитивным расстройствам. У этого типа моделей отмечается высокая смертность по сравнению с другими, вероятно, в связи с повреждением стволовых структур мозга [20, 21].

Для воспроизведения модели контролируемого коркового удара (CCI) используется пневматическое или электромагнитное устройство, при этом наносится травма на открытую неповрежденную твердую мозговую оболочку, что вызывает повреждение корковой ткани, сопровождается острой субдуральной гематомой, аксональной травмой, сотрясением мозга, отеком, деструкцией гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и даже комой [22]. Воздействие, оказываемое на неповрежденную твердую мозговую оболочку через одностороннюю краниотомию в области теменной коры, вызывая деформацию коркового вещества, может диффузно распространиться и привести к гиппокампальной и таламической дегенерации.

Преимущество этой модели ЧМТ перед другими моделями — возможность управлять такими факторами, как время, скорость и глубина воздействия. В зависимости от степени повреждения функциональные нарушения сохраняются длительное время, вплоть до 1 года, спонтанное восстановление полностью невозможно.

*Метод криогенной травмы у грызунов* [23–25] ведет к диффузному мозговому повреждению. Травма головного мозга в этой модели обычно производится с помощью помещения на твердую мозговую оболочку мед-

ного цилиндра, заполненного смесью ацетона и сухого льда ( $78^{\circ}\text{C}$ ) или шарика льда. У крыс при такой ЧМТ происходит повреждение мозговой ткани, причем первичное повреждение окружено областью полутени, где вторичные процессы приводят к расширению размера повреждения, сопровождаемого нейронным некрозом, цитостатическим и сосудистым отеком, активацией астроцитов и воспалением. Эта модель только условно воспроизводит клиническую картину ЧМТ и наиболее подходит для исследования нарушений ГЭБ и отека мозга.

Однако один тип модели не может воспроизвести весь спектр функциональных расстройств, возникающих при ЧМТ, поэтому выбор модели определяется поставленными экспериментальными задачами.

*Цель данного исследования* — создание модели дозированной открытой черепно-мозговой травмы в эксперименте на крысах, исследование неврологических расстройств, дискоординации движений и морфофункциональных изменений головного мозга в разные сроки после ЧМТ. Для выполнения этой задачи создана установка, которая позволяет использовать градуированное по высоте падение груза весом 50—60 г на мозг крысы с целью создания локальной или диффузной ЧМТ разной степени тяжести. Травматическое воздействие осуществляется через черепное окно при сохранной мозговой оболочке.

Голова животного, находящегося под наркозом, закреплена в стереотаксическом приборе и с помощью стереотаксического атласа мозга крысы определяются координаты области повреждения мозга.

Функциональные показатели двигательных, координационных и других нарушений, вызванных ЧМТ разной степени тяжести, предполагается анализировать в разные сроки после ЧМТ при длительном наблюдении.

Морфологический анализ повреждения мозга при ЧМТ разной степени тяжести оценивается на серийных окрашенных гистологических срезах и выборочно с помощью МРТ анализа. С помощью световой микроскопии будет дано описание повреждения ткани мозга в зависимости от тяжести ЧМТ.

В настоящем исследовании используются неврологические тесты, которые наиболее эффективно показали себя в оценке долгосрочного сенсомоторного дефицита у крыс: тест «Цилиндр» для оценки асимметрии использования передних конечностей, тест «Сужающаяся дорожка», выявляющий опорно-двигательный дефицит, также используется система балльной оценки неврологического дефицита — тест «Постановка конечности на опору». Весь процесс оценки неврологических показателей фиксируется на видеокамеру и полученные функциональные показатели соотносятся со степенью тяжести ЧМТ, подвергаются статистической обработке и графическому оформлению.

Сопоставление функциональных и морфологических показателей позволит прогнозировать реабили-

тационный потенциал при разной степени тяжести ЧМТ в эксперименте.

### Список литературы

1. Maegele M, Engel D, Bouillon B. et al. Schaefer U, Klug N, Neugebauer E: Incidence and outcome of traumatic brain injury in an urban area in Western Europe over 10 years. *Eur Surg Res.* 2007; 39: 372-9.
2. Белошицкий В.В. Принципы моделирования черепно-мозговой травмы в эксперименте. *Украинский нейрохирургический журнал.* 2008;4: 9-15.
3. Цымбалюк В.И., Кочин О.В. Экспериментальное моделирование черепно-мозговой травмы. *Украинский нейрохирургический журнал.* 2008; 2:10-2.
4. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж. П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Высш. школа, 1991.
5. Statler KD, Jenkins LW, Dixon CE, Clark RS, Mari-on DW, Kochanek PM: The simple model versus the super model: translating experimental traumatic brain injury research to the bedside. *J Neurotrauma.* 2001; 18: 1195-206.
6. Fennie J. Animal models of traumatic brain injury :a review. *Aust Vet. J.* 2001; 79(9): 628-33.
7. Albert-Weissenberger Ch., Siren A-L. Experimental traumatic brain injury. *Experimental and Translational Stroke Medicine.* 2010; 2: 16.
8. Ye Xiong, Mahmood A., Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14 (2): 128-142.
9. Laurer H.L., Lenzlinger P.M., McIntosh T.K. Models of traumatic brain injury. *Eur. J. Trauma.* 2000; 3: 95-110.
10. Flierl MA, Stahel PF, Beauchamp KM, Morgan SJ, Smith WR, Shohami E. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nat Protoc.* 2009; 4: 1328-37.
11. Blaha M, Schwab J, Vajnerova O, Bednar M, Vajner L, Michal T: Intracranial pressure and experimental model of diffuse brain injury in rats. *J Korean Neurosurg Soc.* 2010; 47: 7-10.
12. Adelson PD, Robichaud P, Hamilton RL, Kochanek PM: A model of diffuse traumatic brain injury in the immature rat. *J Neurosurg.* 1996; 85: 877-84.
13. Chen Y, Constantini S, Trembovler V, Weinstock M, Shohami E. An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. *J Neurotrauma.* 1996; 13: 557-68.
14. Kilbourne M., Kuehn R., Tosun C., Caridi J., Keledjian K., Bochicchio G. et al. Novel model of frontal impact closed head injury in the rat. *J Neurotrauma.* 2009; 26: 2233-43.
15. Longhi L., Laurer H., Maegele M., Neugebauer E., Graham D.J., Stocchetti N., McIntosh T.K. Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? *Neuroscience.* 2005; 136: 971-89.
16. Cernak I. Animal models of head trauma. *Neuro Rx.* 2005; 2: 410-22.
17. Isaksson J., Hillered L., Olsson Y. Cognitive and histopathological outcome after weight-drop brain injury in the rat: influence of systemic administration of monoclonal antibodies to ICAM-1. *Acta Neuropathol.* 2001; 102: 246-56.
18. Allen GV, Gerami D, Esser MJ: Conditioning effects of repetitive mild neurotrauma on motor function in an animal model of focal brain injury. *Neuroscience.* 2000; 99: 93-105.
19. Thompson HJ, Lifshitz J, Marklund N, Grady MS, Graham DI, Hovda DA, McIntosh TK: Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. *J Neurotrauma.* 2005; 22: 42-75.

20. Spain A, Dumas S, Lifshitz J, Rhodes J, Andrews PJ, Horsburgh K, Fowler JH: Mild Fluid Percussion Injury in Mice Produces Evolving Selective Axonal Pathology and Cognitive Deficits Relevant to Human Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2010; 27(8); 1429-38.

21. Kelley BJ, Lifshitz J, Povlishock JT: Neuroinflammatory responses after experimental diffuse traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007; 66: 989-1001.

22. Elliott MB, Jallo JJ, Tuma RF: An investigation of cerebral edema and injury volume assessments for controlled cortical impact injury. *J Neurosci Methods*. 2008; 168: 320-4.

23. Quintana A., Giralt M., Rojas S. et al. Differential role of tumor necrosis factor receptors in mouse brain inflammatory responses in cryolesion brain injury. *J Neurosci Res*. 2005; 82: 701-16.

24. Siren AL, Radyushkin K, Boretius S, Kammer D, Riechers CC, Natt O, et al. Global brain atrophy after unilateral parietal lesion and its prevention by erythropoietin. *Brain*. 2006; 129: 480-9.

25. Eriskat J, Furst M, Stoffel M, Baethmann A: Correlation of lesion volume and brain swelling from a focal brain trauma. *Acta Neurochir Suppl*. 2003, 86:265-6.

Поступила 06.04.15

## References

1. Maegele M, Engel D, Bouillon B, Schaefer U, Klug N, Neugebauer E: Incidence and outcome of traumatic brain injury in an urban area in Western Europe over 10 years. *Eur Surg Res*. 2007; 39: 372-9.

2. Beloshickij V.V. The principles of experimental traumatic brain injury modeling. *Ukrainskij neirohirurgicheskij zhurnal*. 2008; 4: 9-15. (in Russian)

3. Cymbalyuk V.I., Kochin O.V. Experimental modeling of head injury. *Ukrainskij neirohirurgicheskij zhurnal*. 2008; 2:10-2. (in Russian)

4. Buresh Ja., Bureshova O., Hjuston Dzh.P. *Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior*. M.; Vyssh. Shkola, 1991. (in Russian)

5. Statler KD, Jenkins LW, Dixon CE, Clark RS, Marion DW, Kochanek PM: The simple model versus the super model: translating experimental traumatic brain injury research to the bedside. *J Neurotrauma*. 2001;18 (1): 1195-206.

6. Fennie J. Animal models of traumatic brain injury: a review. *Aust Vet. J*. 2001; 79(9): 628-33.

7. *Albert-Weissenberger Ch., Siren A-L*. Experimental traumatic brain injury. *Experimental and Translational Stroke Medicine*. 2010; (2): 16.

8. Ye Xiong, Asim Mahmood, Michael Chopp Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci*. 2013; 14(2): 128-42.

9. Laurer H.L., Lenzlinger P.M., McIntosh T.K. Models of traumatic brain injury. *Eur. J. Trauma*. 2000; (3): 95-110.

10. Flierl MA, Stahel PF, Beauchamp KM, Morgan SJ, Smith WR, Shohami E. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nat. Protoc*. 2009; 4: 1328-37.

11. Blaha M, Schwab J, Vajnerova O, Bednar M, Vajner L, Michal T. Intracranial pressure and experimental model of diffuse brain injury in rats. *J Korean Neurosurg Soc*. 2010; 47 (1): 7-10.

12. Adelson PD, Robichaud P, Hamilton RL, Kochanek PM: A model of diffuse traumatic brain injury in the immature rat. *J Neurosurg*. 1996; 85:877-84.

13. Chen Y, Constantini S, Trembovler V, Weinstock M, Shohami E. An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. *J Neurotrauma*. 1996; 13: 557-68.

14. Kilbourne M, Kuehn R, Tosun C, Caridi J, Keledjian K, Bochicchio G, Scalea T, Gerzanich V, Simard JM. Novel model of frontal impact closed head injury in the rat. *J Neurotrauma*. 2009; 26: 2233-43.

15. Longhi L, Laurer H, Maegele M, Neugebauer E, Graham DJ, Stocchetti N, McIntosh TK: Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? *Neuroscience*. 2005; 136: 971-89.

16. Cernak I: Animal models of head trauma. *Neuro Rx*. 2005; (2): 410-22.

17. Isaksson J, Hillered L, Olsson Y: Cognitive and histopathological outcome after weight-drop brain injury in the rat: influence of systemic administration of monoclonal antibodies to ICAM-1. *Acta Neuropathol*. 2001; 102: 246-256.

18. Allen GV, Gerami D, Esser MJ: Conditioning effects of repetitive mild neurotrauma on motor function in an animal model of focal brain injury. *Neuroscience*. 2000; 99: 93-105.

19. Thompson HJ, Lifshitz J, Marklund N, Grady MS, Graham DI, Hovda DA, McIntosh TK. Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. *J Neurotrauma*. 2005; 22: 42-75.

20. Spain A, Dumas S, Lifshitz J, Rhodes J, Andrews P.J, Horsburgh K, Fowler J.H. Mild Fluid Percussion Injury in Mice Produces Evolving Selective Axonal Pathology and Cognitive Deficits Relevant to Human Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2010; 27(8) 1429-38.

21. Kelley BJ, Lifshitz J, Povlishock JT. Neuroinflammatory responses after experimental diffuse traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007; 66: 989-1001.

22. Elliott MB, Jallo JJ, Tuma RF: An investigation of cerebral edema and injury volume assessments for controlled cortical impact injury. *J Neurosci Methods*. 2008; 168: 320-4.

23. Quintana A., Giralt M., Rojas S. et al. Differential role of tumor necrosis factor receptors in mouse brain inflammatory responses in cryolesion brain injury. *J Neurosci. Res*. 2005; 82: 701-16.

24. Siren AL, Radyushkin K, Boretius S, Kammer D, Riechers CC, Natt O, Sargin D, Watanabe T, Sperling S, Michaelis T, Price J, Meyer B, Frahm J, Ehrenreich H. Global brain atrophy after unilateral parietal lesion and its prevention by erythropoietin. *Brain*. 2006; 129: 480-9.

25. Eriskat J, Furst M, Stoffel M, Baethmann A. Correlation of lesion volume and brain swelling from a focal brain trauma. *Acta Neurochir. (Suppl)* 2003; 86: 265-6.

Received 06.04.15

## Сведения об авторах:

Шакова Фатимат Мухамедовна, к.м.н., вед. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы ФГБНУ НИИ ОПП Парфёнов А.Л., к.м.н., гл. реаниматолог, ФГБИ «Госпиталь для инкурабельных больных — научный лечебно-реабилитационный центр»



© Тезиков Е.Б., Литвицкий П.Ф., 2015  
УДК 616-092

Тезиков Е.Б., Литвицкий П.Ф.

## **Электрофизиологические признаки синдрома отмены этанола на изолированном перфузируемом мозге крыс**

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Москва, Большая Пироговская ул. 2-4

*На изолированном мозге крыс, предварительно подвергшихся алкоголизации, исследовали ЭКoГ (энергетический спектр и среднюю амплитуду) при перфузии мозга с этанолом и после его отмены. У 55% препаратов мозга в период отмены этанола регистрировалась постоянная эпилептиформная активность, что значительно превышало частоту развития судорог у крыс in vivo (25%). Различия в показателях ЭКoГ в условиях in vitro и in vivo обусловлены высокой скоростью элиминации этанола. Так, через 2 мин после прекращения инфузии этанола его концентрация в оттекающем от мозга растворе снижалась с 65 Мм/л до 7 мМ/л. За 105 мин перфузии было воспроизведено 3 периода отмены этанола продолжительностью 5, 10 и 20 мин. Обнаружена высокая положительная корреляция между показателями ЭКoГ на 5-й мин после 1-й отмены этанола и данными показателями за тот же период при 2-й и 3-й отменами этанола. Пролонгирование отмены этанола на препаратах с эпилептиформной активностью более 5 мин приводило к развитию отека мозга и его гибели. Изолированный мозг крысы позволяет неоднократно воспроизвести электрофизиологические признаки синдрома отмены этанола, которые регистрируются у животных in vivo. Разработанный алгоритм перфузии изолированного мозга, предварительно алкоголизованных крыс, может использоваться как модель для исследования механизмов развития судорожной активности и тестирования фармакологических препаратов, купирующих синдром отмены этанола.*

**Ключевые слова:** изолированный мозг крыс; синдром отмены этанола; энергетический спектр ЭКoГ; алгоритмы перфузии мозга

Tezikov E.B., Litvicki P.F.

## **Electrophysiological features (EEG) of ethanol withdrawal syndromes on isolated perfused rat brain**

I.M. Sechenov First Moscow Medical University, 119991, 2-4 Bolshaya Pirogovskaya st., Moscow, Russia

*On isolated rat brains we studied native EEG and its derivatives (mean EEG amplitude and power spectrums — Fourier transformation) during perfusion with ethanol (65 Mm/L) and after its withdrawal. Previously rats were undergone ethanol burden for 6 days according to Majchrowicz procedures to get alcohol withdrawal syndrome. Duration perfusion without ethanol was 5, 10 and 20 min depending on the experimental schedule. Ethanol infusion between periods of withdrawal comprised 20 min. 55% of isolated brains shown epileptiform activity after 1–2 min of ethanol withdrawal but others manifested only increased mean amplitude and the power spectrums of EEG as well as an appearance of single or batch spikes. Differences between in vivo and in vitro conditions can be explained by the accelerated rate of ethanol elimination. The high positive correlation was obtained between EEG findings at the 5-th min of the first ethanol withdrawal and the same findings at the 5-th min of ethanol withdrawal in the second and the third episodes of ethanol withdrawal. Prolongation of withdrawal period more than 5<sup>th</sup> min caused brain death showing epileptiform activity. Isolated rat brain is the convenient subject to study pathogenesis of excitability of neurons and examination of drugs to treat alcohol withdrawal syndrome.*

**Key words:** alcohol withdrawal syndrome; isolated perfused rat brain; EEG findings; ethanol withdrawal schedule

---

Для корреспонденции: Тезиков Евгений Борисович, д.м.н., проф. кафедры патофизиологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова; e-mail: Tezikov.mma@gmail.com.



Синдром отмены этанола у животных в большинстве исследований оценивают визуально, используя по-луколичественные шкалы [1, 2]. Такая оценка субъективна, признаки у животных появляются неодновременно, имеют разную продолжительность и выраженность. В основе синдрома отмены этанола лежит гипервозбудимость ЦНС, которая может быть количественно оценена с помощью показателей ЭЭГ. Изменения на ЭЭГ по времени и выраженности совпадают с манифестацией внешних признаков синдрома отмены этанола [3]. Однако регистрация ЭЭГ в качестве оценки тяжести синдрома отмены этанола не получила широкого распространения из-за трудоемкости метода (фиксация электродов у многих животных, одновременная оценка ЭЭГ, продолжительность регистрации). Кроме того, если в задачу исследования входит тестирование нескольких препаратов в разных дозах на одном животном, то в условиях *in vivo* это неосуществимо. Этих недостатков можно избежать, используя изолированный перфузируемый мозг крысы. Препарат изолированного мозга крысы позволит точно стандартизировать концентрацию этанола и фармакологических препаратов в перфузионной жидкости, обеспечить их быструю элиминацию, а так же неоднократно воспроизвести электрофизиологические признаки отмены и эффекты фармакологических препаратов на одном мозге животного за короткий промежуток времени. Гипервозбудимость ЦНС, включая эпилептиформную активность, хорошо воспроизводятся на ЭЭГ изолированного мозга животных [4, 5].

*Цель исследования* — разработка модели воспроизведения электрофизиологических признаков синдрома отмены этанола на одном препарате изолированного мозга крысы и алгоритма для тестирования препаратов, устраняющих или облегчающих течение данного синдрома.

## Методика

### *Моделирование синдрома отмены этанола на изолированном мозге крысы*

Синдром отмены этанола воспроизводили на 27 крысах-самцах ACI x Wistar по методу Majchrowicz [1]. Через 12 часов после последнего введения этанола животным внутрижелудочно вводили 25% раствор этанола в дозе 1—4 г/кг для предупреждения развития синдрома. Затем крыс наркотизировали уретаном, доза которого составляла 0,1—0,5 г/кг. Хирургическая техника приготовления препарата изолированного мозга, устройство для перфузии, режим оксигенации раствора при повышенном барометрическом давлении, а также состав перфузионной жидкости был разработан нами ранее [6]. В ходе операции вместо уретана в перфузионный раствор вводили 25% раствор этанола со скоростью, при которой его конечная

концентрация составляла 65—87 Мм/л. После завершения операции (перфузия мозга осуществлялась только через внутренние сонные артерии) концентрацию этанола в растворе поддерживали на уровне 65 Мм/л, так как при меньшей концентрации (32,6 Мм/л) у некоторых препаратов сохранялась судорожная активность на ЭКоГ (электрокортикограмма). Через 30 мин инфузию этанола в раствор прекращали на 5 мин. Затем вновь вводили этанол в течение 20 мин. Во второй раз подачу этанола прекращали на 10 мин, а затем вновь инфузирвали этанол в течение 20 мин. Третий период без введения этанола составлял 20 мин. ЭКоГ и перфузионное давление (ПД) регистрировали за 1 мин до прекращения инфузии этанола и на 5-й, 10-й и 20-й мин после его отмены. Электрический сигнал от электродов, регистрирующих ЭКоГ, через усилитель S71 Coulborn instruments (США) поступал в аналого-цифровой преобразователь L2508, а затем в компьютер для последующей обработки. Специальная компьютерная программа рассчитывала мощности ритмов ЭКоГ (быстрое преобразование Фурье). Энергетический спектр оценивали для частот: — 0,98—4, (Delta-rhythm) — 4—7,6 (Theta-rhythm) — 7,6—13,2 (Alpha-rhythm) — 13,2—32 (Beta-rhythm) Гц. Эта же программа рассчитывала среднюю амплитуду ЭКоГ по peak-to-peak на основе метода предложенного Saunders [7]. Расчет мощностей ЭКоГ и ее амплитуды производили за 50 с, а также наблюдали за изменением этих показателей в режиме on-line.

Этанол в перфузионной жидкости определяли методом газовой хроматографии [8]. Математическую обработку результатов проводили с помощью статистических программ Microstat и Statistica. Данные представлены как  $M \pm m$  по критерию t-statistic. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Отмена этанола не приводит к существенному изменению ЭКоГ у контрольных препаратов (рис. 1). Препараты мозга крыс, подвергшихся алкоголизации, были разделены на 2 группы в зависимости от характера ЭКоГ после отмены этанола. В I группе, которая составляла примерно 45%, через 5 мин после отмены этанола наблюдалось увеличение амплитуды ЭКоГ. Эпизодически регистрировали единичные или непродолжительные групповые судорожные разряды (рис. 2). Во II группе примерно через 1,5—3 мин после прекращения введения этанола ЭКоГ была представлена постоянными судорожными разрядами (рис. 3). Средняя частота спайков достигала 6—9 в секунду. Следует отметить, что при оценке выраженности синдрома отмены этанола *in vivo* максимальный балл присваивается за появление у животных судорог.

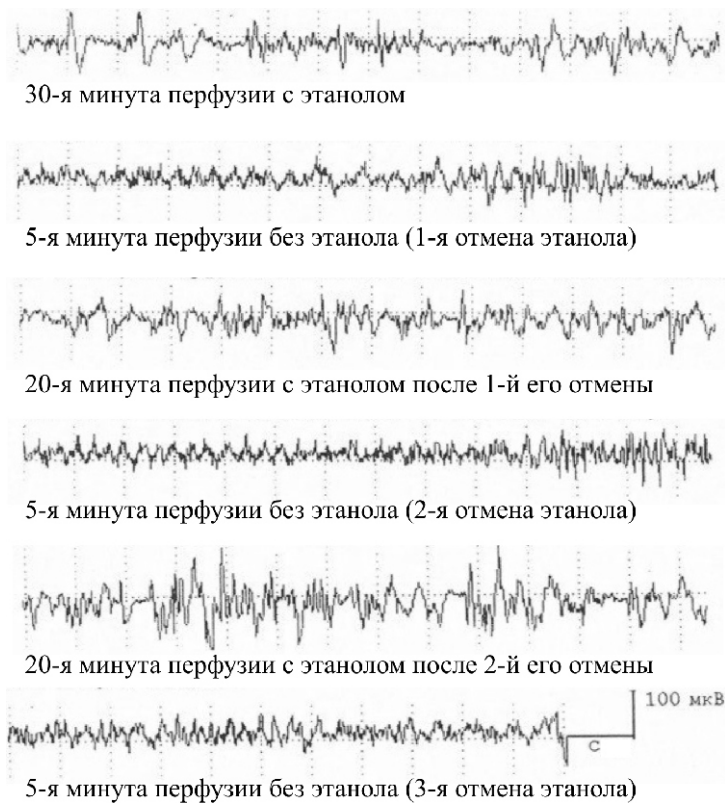


Рис. 1. Влияние этанола и его отмены на изолированный мозг крыс контрольной группы.

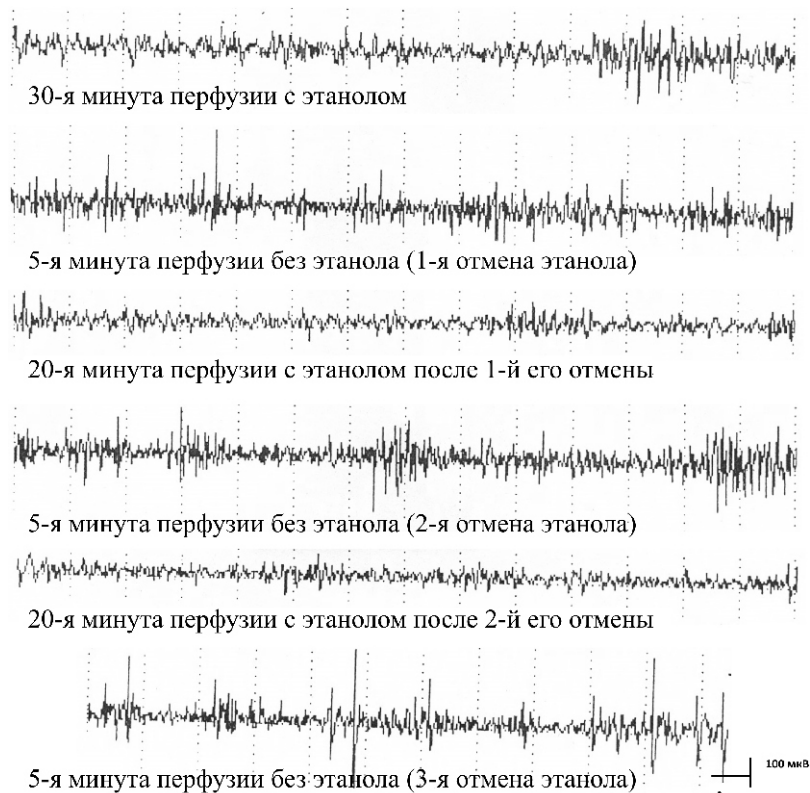


Рис. 2. Влияние этанола и его отмены на изолированный мозг крыс I опытной группы.

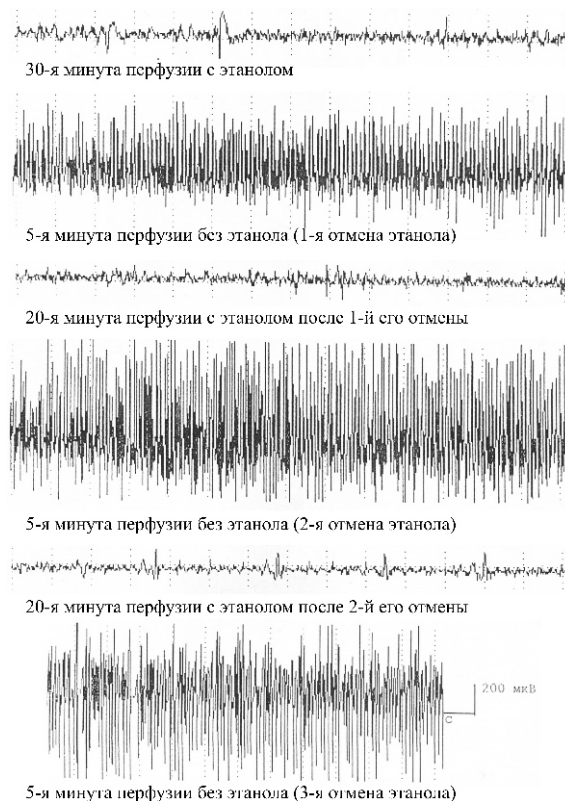


Рис. 3. Влияние этанола и его отмены на изолированный мозг крыс II опытной группы.

На фоне действия этанола мощность ритмов ЭКОГ и ее амплитуда у препаратов мозга контрольных крыс и крыс I и II групп существенно различались. Поэтому мы рассчитывали разницу между значениями мощностями волн ЭКОГ на фоне действия этанола и после его отмены. Изменение энергетического спектра и амплитуды ЭКОГ у препаратов мозга контрольных животных и у препаратов I и II опытных групп в разные сроки после 3-х периодов отмен этанола представлены в табл. 1.

Из таблицы видно, что во II группе на 10-й минуте отмены этанола мощность ритмов и амплитуда ЭКОГ были существенно ниже, чем на 5-й минуте. Судорожная активность во II группе поддерживалась не более 5—8 минут, а затем происходило «уплощение» ЭКОГ и резкий подъем ПД. После 2-й отмены этанола 4 препарата из 10 погибали, а после 3-й отмены выжило лишь 4 препарата.

Средняя частота развития судорог у крыс в условиях *in vivo* составляла примерно 25%, а на препаратах головного мозга судорожная активность на ЭКОГ регистрировалась более чем в 50% случаев. Эти различия в экспериментах *in vivo* и *in vitro* обусловлены тем, что в условиях *in vivo* практически полная элиминация этанола при его концентрации в крови 3 г/л происходит на протяжении нескольких часов, а на препарате

изолированного мозга в течение минут. Так, через 2 мин после прекращения инфузии этанола его концентрация в оттекающем от мозга растворе составляла  $7,6 \pm 3,4$  мМ/л ( $n = 10$ ). Pohorecky и соавт. [9] показали, что постепенное снижение дозы этанола после основного периода алкоголизации может полностью предотвратить развитие синдрома отмены.

Во II опытной группе максимальный прирост мощности ритмов и амплитуды ЭКОГ регистрировался на 5-й минуте всех периодов отмены, а в I группе эти показатели были примерно одинаковы. Мощность медленных ритмов имела большую дисперсию, чем мощности альфа- и бета-ритмов. Результаты корреляционного анализа мощностей ритмов ЭКОГ в разные периоды отмены этанола представлены в табл. 2 и 3 свидетельствуют о высокой воспроизводимости изменения мощности ритмов и амплитуды ЭКОГ только на 5-й мин отмены. На 10 мин периода отмены такой зависимости не обнаружено. В основе синдрома отмены этанола лежат адаптивные изменения в нейронах головного мозга [10]. Степень адаптации у каждого животного индивидуальна, что и объясняет отличие электрофизиологических проявлений на ЭКОГ при отмене этанола у разных крыс. У той же самой крысы эти изменения в мозге идентичны, что объясняет высокую корреляцию между показателями ЭКОГ в разные периоды отмены этанола.

Таблица 1

Изменение показателей ЭКоГ после отмены этанола у препаратов мозга крыс контрольной и опытных групп в разные сроки после 1-го, 2-го и 3-го периодов отмены этанола

Время	Группы	n	Амплитуда ЭКоГ (мкВ)	Мощность ритмов ЭКоГ (относительные единицы)			
				Delta	Theta	Alpha	Beta
5-я мин 1-й отмены	Контр. гр.	9	3 ± 4	0,6 ± 3,6	0,2 ± 0,6	0,3 ± 0,3	0,7 ± 4,4
	Гр. I	8	95 ± 20*	30 ± 37	8 ± 7	6 ± 2*	15 ± 4*
	Гр. II	10	710 ± 162*#	1157 ± 656	421 ± 198	223 ± 66*#	397 ± 108*#
5-я мин 2-й отмены	Контр. гр.	9	9 ± 11	0,3 ± 3,6	0,2 ± 1,4	0,2 ± 0,8	1,1 ± 0,6
	Гр. I	8	110 ± 18*	8 ± 7	2 ± 6	4 ± 4	13 ± 3
	Гр. II	10	978 ± 174*#	727 ± 254*#	1145 ± 388*#	441 ± 89*#	471 ± 86
10-я мин 2-й отмены	Контр. гр.	9	1 ± 7	2,6 ± 3,2	1,2 ± 1,2	0,5 ± 0,7	0,3 ± 0,7
	Гр. I	8	101 ± 17*	76 ± 43	14 ± 6*	9 ± 3*	12 ± 4*
	Гр. II	10	266 ± 158	201 ± 98	307 ± 180	167 ± 79	148 ± 87
5-я мин 3-й отмены	Контр. гр.	7	17 ± 13	5,3 ± 5,3	2,7 ± ,7	2 ± 1,3	0,8 ± 0,5
	Гр. I	7	115 ± 32*	5 ± 6	12 ± 6*	13 ± 5*	30 ± 11*
	Гр. II	6	1472 ± 372*#	225 ± 65*#	1406 ± 715	431 ± 93*#	807 ± 199*#
10-я мин 3-й отмены	Контр. гр.	7	14 ± 14	6,1 ± 4,7	2,2 ± 1,9	1,9 ± 1,2	0,9 ± 0,5
	Гр. I	7	219 ± 126	13 ± 9	25 ± 12	50 ± 36	70 ± 45
	Гр. II	6	609 ± 293*	627 ± 482	499 ± 193*#	623 ± 264*#	609 ± 293*
20-я мин 3-й отмены	Контр. гр.	7	9 ± 6	5,6 ± 3,7	1,4 ± 1,6	1,4 ± 1,1	0,9 ± 0,2
	Гр. I	7	174 ± 117	0,1 ± 2,9	53 ± 44	64 ± 51	53 ± 35
	Гр. II	4	157 ± 114	438 ± 187*#	287 ± 149*	288 ± 170*	204 ± 119*

Примечание. \* — различия в сравнении с контролем  $p < 0,05$ ; # — различия между контрольной и I и II опытными группами  $p < 0,05$

Таблица 2

Коэффициент корреляции между амплитудой ЭКоГ и мощностью ее ритмов на 5-й минуте первого периода отмены этанола и на 5-й минуте второго и третьего периодов отмены

Амплитуда ЭКоГ и мощность ее ритмов в разные периоды отмены этанола		5-я минута 1-го периода отмены этанола				
		Амплитуда	Дельта	Тета	Альфа	Бета
5-я минута 2-го периода отмены, n = 18	Амплитуда	+0,83*				
	Дельта		+0,43			
	Тета			+0,94*		
	Альфа				+0,81*	
	Бета					0,79*
5-я минута 3-го периода отмены, n = 12	Амплитуда	+0,62*				
	Дельта		+0,64*			
	Тета			+0,97*		
	Альфа				+0,75*	
	Бета					+0,51

Примечание. \* — отмечены достоверные значения коэффициента при  $p < 0,05$

Таблица 3

Коэффициент корреляции между амплитудой ЭКоГ и мощностью ее ритмов на 5-й минуте второго периода отмены этанола и такими же показателями на 5-й минуте третьего периодов отмены

Амплитуда ЭКоГ и мощность ее ритмов в разные периоды отмены этанола		5-я минута 2-го периода отмены этанола				
		Амплитуда	Дельта	Тета	Альфа	Бета
5-я минута 3-го периода отмены, n = 11	Амплитуда	+0,82*				
	Дельта		+0,75*			
	Тета			+0,99*		
	Альфа				+0,87*	
	Бета					+0,67*

Примечание. \* — отмечены достоверные значения коэффициента при  $p < 0,05$



Изменение перфузионного давления у препаратов мозга контрольной группы и I и II опытных групп в разные периоды отмены этанола

Периоды перфузии без этанола	Контроль	I группа	II группа
5-я мин 1-го периода	5 ± 1 n = 9	7 ± 1 n = 8	11 ± 1* n = 9
5-я мин 2-го периода	6 ± 1 n = 9	8 ± 1 n = 8	15 ± 1** n = 9
10-я мин 2-го периода	6 ± 1 n = 8	5 ± 1 n = 8	4 ± 7 n = 8
5-я мин 3-го периода	5 ± 1 n = 6	8 ± 1 n = 7	15 ± 2** n = 5
10-я мин 3-го периода	5 ± 1 n = 6	8 ± 2 n = 7	13 ± 2* n = 4

Примечание. \* — достоверные различия с контролем,  $p < 0,05$ ; # — достоверные различия между I и II группами,  $p < 0,05$

Таким образом, продолжительность перфузии без этанола при многократном моделировании его отмены не должна превышать 5 мин. На 5-7-й мин электрическая активность мозга достигает максимума и ее величина хорошо воспроизводится при последующих периодах отмены этанола. Перфузия без этанола свыше 5—7 мин ведет к росту дисперсии показателей ЭКоГ и гибели мозга препаратов II группы. Инфузия этанола в используемой концентрации между периодами отмены должна составлять не менее 15—20 мин, так как за это время происходит восстановление исходной ЭКоГ и ПД.

Прекращение инфузии этанола вызывало небольшое снижение ПД в контрольной и I группе, что было обусловлено устранением введения дополнительного объема раствора (табл. 4). Во II группе ПД снижалось в значительно большей степени и это, вероятно, было связано с массивным высвобождением эндогенных вазодилаторов. Отрицательная корреляция на между ПД и амплитудой ЭКоГ, мощностями дельта-, тета-, альфа- и бета-ритмов на 5-й мин первого периода отмены этанола составляла 0,61 ( $p < 0,03$ ,  $n = 18$ ), 0,66 ( $p < 0,01$ ,  $n = 18$ ), 0,71 ( $p < 0,001$ ,  $n = 18$ ), 0,75 ( $p < 0,0001$ ,  $n = 18$ ) и 0,73 ( $p < 0,0001$ ,  $n = 18$ ) соответственно.

Возобновление инфузии этанола после периода отмены устраняло спайковую активность на ЭКоГ в течение 30—60 с. Одновременно происходило и увеличение ПД, которое восстанавливалось через 2—3 мин. Во II группе, если период отмены был более 5 мин, ПД начинало быстро повышаться, что совпадало с урежением частоты судорожных спайков и уплощением ЭКоГ. В последнем случае ПД могло превышать исходные значения на  $30 \pm 7$  мм рт.ст. У некоторых препаратов ПД продолжало расти, достигая 100—120 мм рт.ст., и ЭКоГ уже не восстанавливалась. Одновременно мы наблюдали резкое набухание ткани мозга, что объясняется развитием цитотоксического отека.

## Заключение

На изолированном мозге крыс электрофизиологические признаки синдрома отмены этанола (эпилептиформная судорожная активность) возникают чаще, чем, судороги в условиях *in vivo*. Данная модель, судя по показателям ЭКоЭ, имеет высокую степень воспроизводимости на одном препарате изолированного мозга, что подтверждается корреляционным анализом показателей ЭКоГ. Нами разработан алгоритм перфузии мозга с этанолом, его концентрации, а также продолжительность периодов отмены этанола, которые не приводят к повреждению нейронов мозга. Изолированный перфузируемый мозг крыс, предварительно подвергшихся алкоголизации, может служить наиболее удобным объектом для изучения состояния мозга при синдроме отмены этанола, а так же для изучения механизмов развития спонтанных судорог и тестирования препаратов, купирующих это состояние. Кроме того, данная модель позволяет избежать влияния расстройств микроциркуляции [11].

## Список литературы

1. Majchrowicz E. Induction of physical dependence upon ethanol and the associated behavioral changes in rats. *Psychopharmacology*, 1975; 43 (3): 245-541.
2. Economidou D., Cippitelli A., Stopponi S., Bracconi S., Clementi S. et al. Activation of Brain NOP Receptors Attenuates Acute and Protracted Alcohol Withdrawal Symptoms in Alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011; 35 (4): 747-55.
3. Hunter B.E., Boast C.A., Walker D.W., Zornetzer S.F. Alcohol withdrawal syndrome in rats: neural and behavioral correlates. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1973; 1 (6): 719-25.
4. Librizzi L., Noe F., Vezzani A., de Curtis M., Ravizza T. Seizure-induced brain-borne inflammation sustains seizure recurrence and blood-brain barrier damage. *Ann. Neurol.* 2012; 72 (7): 82-90.
5. Librizzi L., Noe F., Vessani A., Ravizza T. Seizure-induced brain-borne inflammation sustains seizure recurrence

and blood-brain barrier damage. *Annals of Neurology*. 2012; 72 (1): 82-90.

6. Тезиков Е.Б., Пирожков С.В., Нужный В.П. Применение гипербароксигенации перфузируемого раствора для увеличения снабжения изолированного мозга кислородом. *Физиологич. Журнал*. 1995; 81 (9): 146-53.

7. Saunders M.G. Amplitude probability density studies on alpha and alpha-like patterns. *Electroencephalog. Clin. Neurophysiol.* 1963; 15 (5): 761-67.

8. Успенский А.У., Нужный В.П., Абдрашитов Ф.Х., Листвина, В.П. *Об определении содержания этанола, ацетальдегида и ацетона в крови*. М.: Медицина; Биологические основы алкоголизма. 1984: 86 -2.

9. Pohorecky L.H., Jaffe L.S., Berkeley H.A. Ethanol withdrawal in rat: involvement of noradrenergic neurons. *Life Sci*. 1974; 15 (3): 427-37.

10. McGuiler N.S., Padula A.E., Woodward J.J., Mulholland P.J. Withdrawal from chronic intermittent alcohol exposure increases dendritic spine density in the lateral orbitofrontal cortex of mice. *Alcohol*. 2015; 49(1): 21-7.

11. Беленков Ю.Н., Привалова Е.В., Шендрыгина А.А., Чекнева И.С., Емельянова Т.В. Нарушения микроциркуляции у больных ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом 2 типа. *Сеченовский вестник*. 2014; 18(4): 27-33.

Поступила 05.05.15

## References

1. Majchrowicz E. Induction of physical dependence upon ethanol and the associated behavioral changes in rats. *Psychopharmacology*, 1975; 43 (3): 245-541.

2. Economidou D., Cippitelli A., Stopponi S., Bracconi S., Clementi S. et al. Activation of Brain NOP Receptors Attenuates Acute and Protracted Alcohol Withdrawal Symptoms in, Alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011; 35 (4): 747-55.

3. Hunter B.E., Boast C.A., Walker D.W., Zornetzer S.F. Alcohol withdrawal syndrome in rats: neural and behavioral correlates. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1973; 1 (6): 719-25.

4. Librizzi L., Noe F., Vezzani A., de Curtis M., Ravizza T. Seizure-induced brain-borne inflammation sustains seizure recurrence and blood-brain barrier damage. *Ann. Neurol.* 2012; 72 (7): 82-90.

5. Librizzi L., Noe F., Vessani A., Ravizza T. Seizure-induced brain-borne inflammation sustains seizure recurrence and blood-brain barrier damage. *Annals of Neurology*. 2012; 72 (1): 82-90.

6. Tezikov E.B., Piroshkov S.V., Nushnii V.P. Use of hypobaroxigenation of perfusion solution for increase of the oxygen supply to the rat isolated brain. *Sechenov Physiological Journal*, 1995; 81(9): 146-53. (in Russian)

7. Saunders M.G. Amplitude probability density studies on alpha and alpha-like patterns. *Electroencephalog. Clin. Neurophysiol.* 1963; 15 (5): 761-67.

8. Успенский А.У., Нужный В.П., Абдрашитов Ф.Х., Листвина В.П. *Ethanol, acetaldehyde and acetone examination in blood*. М.: Medicine; Biological basics of alcoholism. 1984; 86-2. (in Russian)

9. Pohorecky L.H., Jaffe L.S., Berkeley H.A. Ethanol withdrawal in rat: involvement of noradrenergic neurons. *Life Sci*. 1974; 15 (3): 427-37.

10. McGuiler N.S., Padula A.E., Woodward J.J., Mulholland P.J. Withdrawal from chronic intermittent alcohol exposure increases dendritic spine density in the lateral orbitofrontal cortex of mice. *Alcohol*. 2015; 49(1): 21-7.

11. Belenkov Yu.N., Privalova E.V., Shchendrygina A.A., Chekneva I.S., Emelyanova T.V. Microcirculatory disorders in patients with coronary heart disease and type 2 diabetes. *Sechenov bulletin*. 2014. 18(4): 27-33.

Received 05.05.15

## Сведения об авторах:

Литвицкий Петр Францевич, д.м.н., проф., чл.-корр РАН, зав. кафедрой патофизиологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Москва, Большая Пироговская ул. 2-4

Кубышкин А.В.<sup>1</sup>, Навасардян Г.А.<sup>2</sup>, Гусакова С.В.<sup>3</sup>, Орлов С.Н.<sup>4</sup>, Григорян А.С.<sup>2</sup>, Коваленко Е.П.<sup>1</sup>

## **Патофизиология как мост между медицинской теорией и практикой (информация о VII Конгрессе Международного общества патофизиологов)**

<sup>1</sup> — Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского, Симферополь

<sup>2</sup> — Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци

<sup>3</sup> — Сибирский государственный медицинский университет, Томск

<sup>4</sup> — Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова и Томский Государственный университет

В соответствии с решением, принятым в 2010 г. на VI Конгрессе Международного общества патофизиологов (МОП) в Монреале, с 4 по 7 сентября 2014 г. в г. Рабат (Марокко) прошел очередной, уже VII Конгресс МОП. В этот раз конгресс впервые проходил на африканском континенте, что соответствует принципам и традициям расширения географии МОП, привлечения новых членов и дальнейшего развития патофизиологической науки. Эти принципы были заложены основателем Международного общества патофизиологов академиком Г.Н. Крыжановским еще на Московском учредительном конгрессе в 1990 г. и вот уже четверть века патофизиологи мира встречаются с четкой периодичностью в разных странах и на разных континентах. Каждый раз такие встречи становятся не только полем обмена научными результатами, но и площадкой для поиска новых подходов к развитию патофизиологии и как науки, и как ключевой дисциплины подготовки будущего врача в системе медицинского образования.

В настоящее время высшая профессиональная организация патофизиологов, которой является МОП, объединяет специалистов 53 стран мира. Следует отметить, что в VII конгрессе приняло участие существенно меньшее количество делегаций и участников, чем на двух предыдущих конгрессах в Китае и Канаде. Однако в целом на конгрессе были представлены делегации 24 стран, что составило почти половину коллективных членов МОП. Африканский континент, на площадке которого проходил конгресс, был представлен шестью странами. Общее количество делегатов составило более 200 человек, а с учетом заочного участия более 600 патофизиологов мира приняли участие в конгрессе. В конечном счете более 200 научных работ [1], включая 65 устных и 147 стендовых докладов было представлено на VII конгрессе в ходе лекций, симпозиумов и стендовых сессий.

Россия была представлена патофизиологами из Москвы, Санкт-Петербурга, Томска, Казани и Крыма. Российскими патофизиологами было представлено 10 устных докладов и 22 стендовых сообщения. К со-

жалению, из постсоветских стран на конгрессе были представлены только Армения, Украина и Молдавия. Армянская делегация была организатором одного из симпозиумов и принимала активное участие в обсуждении всех вопросов на конгрессе. К сожалению, по причине политической нестабильности, не смогли принять очное участие в конгрессе представители Украины, от которых было подано 17 заявок.

Конгресс в Марокко был организован на базе факультета естествознания Университета имени Мохамеда V в Рабате и прошел под девизом «Diagnosis and Therapeutic Challenges». Действительно, вся программа конгресса была сформирована с акцентом на роль патофизиологии как науки, позволяющей объяснять и находить понимание по самым сложным вопросам диагностики и лечения заболеваний и патологических процессов. В частности, особое внимание обращалось на тот факт, что практически все новые методы лабораторной молекулярной диагностики и разработка многих новых лекарственных препаратов базируется на достижениях патофизиологии, раскрывающей механизмы и ключевые точки патогенеза патологических процессов, а следовательно позволяющей решать сложные диагностические и лечебные проблемы.

Приятно отметить, что Конгресс открылся вступительным словом президента конгресса, профессора Вейла Бенжеллуна (Weil Benjelloun), в которой были высказаны особые слова уважения, почтения и памяти основателю международного общества патофизиологов профессору Г.Н. Крыжановскому.

На первом пленарном заседании конгресса была представлена лекция Абдеслама Аль Хамличи (Abdeslam El Khamlichi), профессора кафедры нейрохирургии университета Мохамеда V, посвященной наиболее сложным вопросам развития нейрохирургических технологий в Африке и роли патофизиологии в понимании механизмов развития патологии нервной системы. Кроме того, в разные дни конгресса было представлено еще 3 лекции. Лекция профессора Зденко Ковача (Zdenko Kovac) из университета Загреба (Хорватия) была посвящена во-

просам совершенствования преподавания патофизиологии как одной из фундаментальных наук, закладывающих клиническое мышление врача. Вынесенный в заголовок вопрос — как преподавать патофизиологию в постгеномную эру — раскрывает суть поставленной проблемы усвоения огромного количества материала по патофизиологии за относительно короткое время. Автор подробно изложил разработанный им подход использования этиопатогенетических кластеров для систематизации основных патологических состояний и алгоритмов их использования для совершенствования процесса преподавания. Блестящая пленарная лекция была представлена профессором Флоренс Рейно (Florence Raynaud, Лондон, Великобритания), которая уделила внимание новейшим молекулярно-генетическими аспектами патогенеза злокачественных новообразований. Особое внимание было уделено механизмам малигнизации и возможностям поиска новых специфических биомаркеров для диагностики на ранней стадии и оценки прогноза лечения. Завершала программу конгресса очень интересная лекция профессора Мустафы Аль Абси (Mustafa al'Absi, Миннесота, США), посвященная патофизиологическим механизмам стресса и зависимостей, а также посттравматическому стресс-синдрому.

Кроме 4-х пленарных лекций, в рамках конгресса было организовано 10 симпозиумов и 4 секции междисциплинарных устных докладов, в которые, как правило, было включено по 4—6 докладов, отобранных Международным оргкомитетом из числа поданных на Конгресс.

Из проведенных симпозиумов следует выделить симпозиум, посвященный вопросам патофизиологии и психобиологии нарушений ионного транспорта (председатели С.Н.Орлов, представляющий Томский университет и университет Монреаля, и Павел Хамет (Pavel Hamet, университет Монреаля, Канада). В рамках данного симпозиума обсуждались вопросы изучения роли сигнальных путей, зависимых от ионов  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  и не зависимых от ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , в регуляции транскрипции генов (С.Н.Орлов), новый подход к выявлению нарушений сенсомоторной функции с использованием «spread-accuracy trade-off» метода (Д.Баланев, Томск), представлены данные о влиянии IL-5 и рецепторов к IL-5 на контрактильную активность бронхиальной мускулатуры в эксперименте на морских свинках (Л.Капелевич, Томск), освещена роль гидросульфида ( $\text{H}_2\text{S}$ ) как важной сигнальной молекулы в регуляции тонуса сосудов в зависимости от состояния внутриклеточного объема жидкости (С.Гусакова, Томск).

Интересный симпозиум был организован будущими хозяевами следующего конгресса МОП. Он проходил под председательством Ольги Печановой (Olga Pechanova, Братислава, Словакия) и был посвящен изучению различных патофизиологических эффектов ингибитора ренина «Алискирена». В рамках симпозиума обсужда-

лись вопросы влияния алискирена на кардиодинамику и коронарный кровоток изолированного сердца, на развитие оксидативного стресса у спонтанно-гипертензивных крыс и влияние наноинкапсулированного алискирена на различные эффекты у спонтанно-гипертензивных крыс.

Очень интересные доклады были представлены на симпозиумах по изучению молекулярных механизмов ремоделирования миокарда (председатель Янг Хуанг-Тянь (Yang Huang-Tian, Шанхай, Китай), по молекулярным механизмам нейродегенерации и восстановления (председатель Вонг Жян-Ши (Wong Jian-Zhi, Китай) и посвященном изучению молекулярных механизмов влияния традиционной Восточной медицины на реакции организма при лечении различных патологий (председатель Ванг Квиан (Wang Qian, Пекин, Китай)). Еще два симпозиума были посвящены патофизиологии пищеварения (председатель Эрами Мохамед (Ergami Mohammed, Марокко) и патофизиологии допаминэргических и допамин-независимых механизмов развития паркинсонизма (председатели Беназоуз Абдельхамид (Benazzouz Abdelhamid, Франция) и Газал-Лакхад Ноурия (Lakhad-Ghazal Nauria, Марокко).

Всеобщее внимание привлек симпозиум, посвященный изучению онкометаболизма (председатель Мишель Трамбле (Michel Tremblay, Монреаль, Канада). В докладах канадских исследователей Michel Tremblay, Johanne Tremblay и Pavel Hamet (Монреаль) были затронуты различные аспекты молекулярных механизмов онкопатологии, а в докладе Павел Хамет проведены параллели между кардиометаболическими нарушениями и раком на уровне изучения отдельных генов.

Особо следует отметить проведение в рамках конгресса четырех секционных заседаний, каждое из которых состояло из 5—6 докладов, и которые были организованы в отсутствие какой-либо финансовой поддержки от сторонних организаций. Эти секции были посвящены вопросам воспаления, иммунологии и онкологии (председатели Фарок Асади (Farokh Asadi, Чикаго, США) и Юи Жанг (Youyi Zhang, Пекин, Китай)), нейронаукам и психопатологии (председатели Хибы Ахмед Авууда (Hiba Ahmed Awooda, Судан) и Артем Григорян (Армения)), кардиоваскулярной патологии (председатели Енас Абдель-Хади (Enas A.Abdel-Yady, Египет) и Гризельда Навасардян, (Армения), молекулярным механизмам системных патологических процессов (председатели Премжит Гатирам (Premjith Gathiram, ЮАР) и Магда Мохамед (Magda I. Mohamed)). На двух из этих секций прозвучали доклады профессора А.В.Кубышкина (Крымский медуниверситет, Россия), которые вызвали неподдельный интерес. Один из них был посвящен изучению роли воспаления в формировании гиперплазии эндометрия и предложено понятие воспаления, ассоциированного с гиперплазией эндометрия. Второй доклад был посвя-



ищен изучению роли системной воспалительной реакции в развитии шоковых состояний и предложена классификация шоков, основанная на интеграции этих двух понятий.

В рамках конгресса активно работала учебная комиссия МОП (председатель — вице-президент МОП проф. Зденко Ковач (Zdenko Kovac, Загреб, Хорватия). Так, было проведено 2 симпозиума, посвященных вопросам совершенствования преподавания патофизиологии. Модераторами первого симпозиума были Гризельда Навасардян и Артем Григорян (Армения) и Neuparth Nuno и Rendas Antonio (Лиссабон, Португалия). Основными моментами, освещенными в рамках данного симпозиума, были новые возможности организации учебного процесса, обсуждение возможностей использования тестирования в преподавании и контроле знаний по патофизиологии, применения подходов доказательной медицины в процессе обучения и роль самостоятельной научной работы в освоении курса патофизиологии.

Второй симпозиум был организован при активном участии Л.П. Чурилова (Санкт-Петербург, Россия), но в связи с тем, что он по ряду обстоятельств не смог прибыть на конгресс, его модерацию взяли на себя профессор Зденко Ковач (Хорватия) и Анатолий Кубышкин (Россия). На этом симпозиуме в докладе Зденко Ковача были развиты и детализированы разработанные подходы к применению этиопатогенетических кластеров в изучении патофизиологии. Были презентованы учебники, в которых применяется разработанный автором подход и которые используются в процессе преподавания общей и клинической патофизиологии в Загребском университете. В докладе А. Кубышкина основное внимание было сосредоточено на использовании клинических данных при преподавании патофизиологии и презентована технология обучения «key points» (ключевых точек) в объяснении применения основных методов диагностики и лекарственных препаратов с акцентом на ключевые звенья патогенеза заболеваний.

В заключение, конгресс в Марокко решил много организационных вопросов работы МОП. В ходе работы Конгресса было проведено несколько заседаний Президиума МОП, на которых обсуждались пути совершенствования деятельности МОП. Президиум высоко оценил работу оргкомитета, проведенную при подготовке конгресса. На состоявшейся в последний день генеральной ассамблеи МОП были приняты решения по работе общества на следующие 4 года. Важным моментом было существенное обновление президиума МОП, который теперь насчитывает 22 человека. В состав президиума вошли представители 15 стран. По традиции Президентом общества был избран глава локального оргкомитета профессор Wail Benjelloun (Рабат, Марокко),

в качестве уходящего президента остается Pavel Hamet (Монреаль, Канада), а избранным президентом стала организатор будущего конгресса Olga Pechanova (Братислава, Словакия). Вице-президентами были избраны профессор Zdenko Kovac (Хорватия), доктор Steven Greenwald (Великобритания) и доктор Jian-Zhi Wang (Китай). От России в состав президиума избраны профессор С.Н. Орлов и профессор А.В. Кубышкин, от Армении профессор Г.А. Навасардян. В заключение профессор Osmo Hanninen (Финляндия), который многие годы был главным редактором журнала «Pathophysiology», избран почетным членом МОП.

Основными приоритетами в работе нового президента и состава президиума были обозначены: укрепление и консолидация международного общества патофизиологов, укрепление финансовых позиций общества, увеличение количества и качества сервисов для членов МОП, в том числе через электронные рассылки, проведение региональных научных школ, конференций и конгрессов. В настоящее время начата работа по обновлению сайта общества.

Большое внимание планируется уделить совершенствованию основного научного журнала общества «Pathophysiology». Главным редактором журнала избран Steven Alexander (США). Планируется подписать новый контракт с Elsevier, улучшить качество статей с повышением импакт-фактора журнала. Кроме того, планируется основать патофизиологическую неделю и пересмотреть возможность сокращения сроков между конгрессами МОП с четырех до трех лет.

На генеральной ассамблее был презентован ряд проектов. В частности, профессором Зденко Ковачем предложено всем желающим подключиться к работе по созданию истории развития международной патофизиологии в ракурсе наиболее важных достижений биологии и медицины. Коллеги из Армении профессор Гризельда Навасардян и Артем Григорян презентовали международную школу по патофизиологии «A bird's eye view to pathophysiology», проведение которой запланировано на базе Ереванского государственного медицинского университета с 6 по 15 июля 2015 г.

VIII Конгресс МОП было решено проводить в сентябре 2018 г. в г. Братислава (Словакия). Возглавляющая оргкомитет по его подготовке Ольга Печанова провела впечатляющую презентацию Словакии и Братиславы как будущих хозяев предстоящего конгресса МОП.

### Список литературы

1. 7<sup>th</sup> International Congress of Pathophysiology, 4–7 September, 2014, Faculty of Sciences Mohammed V University, Rabat, Morocco. Program & Proceedings, P. 1-174.

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

(составлены с учетом требований Высшей аттестационной комиссии РФ  
и «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы»,  
разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов)

**1. ОБЩИЕ ПРАВИЛА.** Статья должна иметь визу руководителя и сопровождаться официальным направлением от учреждения, из которого выходит статья, в необходимых случаях — экспертным заключением. В направлении следует указать, является ли статья диссертационной.

Статья должна быть подписана всеми авторами, что дает право журналу на ее публикацию в бумажном и (или) электронном формате и размещение на сайте журнала (издательства).

Нельзя направлять в редакцию работы, напечатанные в иных изданиях или отправленные в иные издания.

Редакция оставляет за собой право на сокращение и редактирование присланных статей. Датой поступления статьи считается время поступления окончательного (переработанного) варианта статьи.

**2.** Плата за публикацию рукописей с аспирантов не взимается.

**3.** Статья присылается в редакцию в распечатке (1 экз.) с обязательным приложением электронной версии или по электронной почте.

**4.** Статья должна быть напечатана шрифтом Times New Roman, размер шрифта 14, с двойным интервалом между строками, все поля, кроме левого, шириной 2 см, левое поле 3 см. Все страницы должны быть пронумерованы. Автоматический перенос слов использовать нельзя.

**5. ОБЪЕМ** статей не должен превышать 18 страниц (включая иллюстрации, таблицы, резюме и список литературы), рецензий и информационных сообщений — 3 с.

**6. ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ** должен содержать:

- 1) фамилию и инициалы автора (авторов);
- 2) название статьи;
- 3) полное наименование учреждения, в котором работает автор, в именительном падеже с обязатель-

ным указанием статуса организации (аббревиатура перед названием) и ведомственной принадлежности;

4) полный почтовый адрес учреждения;

5) контактную информацию: Ф.И.О. полностью и адрес электронной почты автора, ответственного за переписку и номер телефона.

Если авторов несколько, после каждой фамилии и соответствующего учреждения проставляется цифровой индекс. Если все авторы статьи работают в одном учреждении, указывать место работы каждого автора отдельно не нужно, достаточно указать учреждение один раз.

**Образец титульного листа:**

Рахманин Ю.А.<sup>1</sup>, Зыкова И.Е.<sup>1</sup>, Федичкина Т.П.<sup>1</sup>, Соленова Л.Г.<sup>2</sup>

Подходы к изучению роли водного фактора в распространности инфекции *Helicobacter pylori*

<sup>1</sup> — Федеральное государственное бюджетное учреждение НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина Минздрава России, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10/15, стр. 1

<sup>2</sup> — ФГБУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАН, 119992, Москва, Каширское ш., 24

**Для корреспонденции:** Соленова Лия Геннадьевна, (указать должность, ученую степень и звание, место работы — отдел, лаб.), e-mail: lsolenova@mail.ru

## 7. ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ РИНЦ

На отдельной странице указываются дополнительные сведения о каждом авторе, необходимые для обработки журнала в Российском индексе научного цитирования: Ф.И.О. полностью на русском языке и в транслитерации, ученая степень, ученое звание, должность, e-mail для контактов с авторами статьи (можно один на всех авторов).

**Образец:**

Рахманин Юрий Анатольевич (Rakhmanin Yu.A.), доктор мед. наук, проф., акад. РАН, директор института;

Зыкова Ирина Евгеньевна (Zykova I.E.), доктор мед. наук, рук. лаб. диагностики экологически зависимой патологии с группой гигиенической экспертизы;

Федичкина Татьяна Павловна (Fedichkina T.P.), канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. диагностики экологически зависимой патологии с группой гигиенической экспертизы, e-mail: fedichkina@yandex.ru

Соленова Лия Геннадьевна (Solenoova L.G.), доктор биол. наук, ст. науч. сотр., e-mail: lsolenoova@mail.ru

**8. Дальнейший ПЛАН ПОСТРОЕНИЯ** оригинальных статей должен быть следующим: подробное резюме (180-200 слов), ключевые слова, краткое введение, отражающее состояние вопроса к моменту написания статьи и задачи настоящего исследования, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы по пунктам или заключение, список цитированной литературы.

Изложение статьи должно быть ясным, сжатым, без длинных исторических введений и повторений. Предпочтение следует отдавать новым и проверенным фактам, результатам длительных исследований, важных для решения практических вопросов.

Методика исследований должна быть описана очень четко, так чтобы ее легко можно было воспроизвести.

При представлении в печать экспериментальных работ следует руководствоваться «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Помимо вида, пола и количества использованных животных, авторы обязательно должны указывать применявшиеся при проведении болезненных процедур методы обезболивания и методы умерщвления животных.

Нужно указать, являются ли приводимые числовые значения первичными или производными, привести пределы точности, надёжности, интервалы достоверности, оценки, рекомендации, принятые или отвергнутые гипотезы, обсуждаемые в статье.

**9. СТАНДАРТЫ.** Все термины и определения должны быть научно достоверны, их написание (как русское, так и латинское) должно соответствовать «Энциклопедическому словарю медицинских терминов» (в 3-х томах, под ред. акад. Б.В. Петровского).

Лекарственные препараты должны быть приведены только в международных непатентованных названиях, которые употребляются первыми, затем в случае необходимости приводятся несколько торговых названий препаратов, зарегистрированных в России (в соответствии с информационно-поисковой систе-

мой «Клифар-Госреестр» [Государственный реестр лекарственных средств]).

Желательно, чтобы написание ферментов соответствовало стандарту Enzyme Classification.

Желательно, чтобы наследуемые или семейные заболевания соответствовали международной классификации наследуемых состояний у человека (Mendelian Inheritance in Man [<http://ncbi.nlm.nih.gov/Omim>]).

Названия микроорганизмов должны быть выверены в соответствии с «Энциклопедическим словарём медицинских терминов» (в 3-х томах, под ред. акад. Б.В. Петровского) или по изданию «Медицинская микробиология» (под ред. В.И. Покровского).

Написание Ф.И.О., упоминаемых в тексте, должно соответствовать списку литературы.

Рукопись может сопровождать словарь терминов (неясных, способных вызвать у читателя затруднения при прочтении).

Помимо общепринятых сокращений единиц измерения, физических, химических и математических величин и терминов (например, ДНК), допускаются аббревиатуры словосочетаний, часто повторяющихся в тексте. Все вводимые автором буквенные обозначения и аббревиатуры должны быть расшифрованы в тексте при их первом упоминании. Не допускаются сокращения простых слов, даже если они часто повторяются.

Дозы лекарственных средств, единицы измерения и другие численные величины должны быть указаны в системе СИ.

## 10. АВТОРСКИЕ РЕЗЮМЕ

Авторское резюме к статье является основным источником информации в отечественных и зарубежных информационных системах и базах данных, индексирующих журнал. Резюме доступно на сайте журнала, на сайте Научной электронной библиотеки и индексируется сетевыми поисковыми системами.

По аннотации к статье читателю должна быть понятна суть исследования. По аннотации читатель должен определить, стоит ли обращаться к полному тексту статьи для получения более подробной, интересующей его информации. Резюме должно излагать только существенные факты работы. Приветствуется структура аннотации, повторяющая структуру статьи и включающая введение, цели и задачи, методы, результаты, заключение (выводы). Однако: предмет, тема, цель работы указываются в том случае, если они не ясны из заглавия статьи; метод или методологию проведения работы целесообразно описывать в том случае, если они отличаются новизной или представляют интерес с точки зрения данной работы.

Резюме должно начинаться с информации, содержащейся на титульном листе. Объем текста авторского резюме определяется содержанием публикации (объемом сведений, их научной ценностью и/или практическим значением) и должен быть в пределах 150-250 слов.

Резюме должно сопровождаться несколькими **КЛЮЧЕВЫМИ СЛОВАМИ** или словосочетаниями, отражающими основную тематику статьи и облегчающими классификацию работы в компьютерных поисковых системах. Ключевые слова перечисляются через точку с запятой. В конце перечисления точка не ставится.

Резюме и ключевые слова должны быть представлены как на русском, так и на английском языках. При переводе фамилии авторов рекомендуется транслитерировать так же, как в предыдущих публикациях или по системе BGN (Board of Geographic Names), см. сайт <http://www.translit.ru>.

В отношении организации(ий) важно, чтобы был указан официально принятый английский вариант наименования.

**11. ТРЕБОВАНИЯ К РИСУНКАМ**, представленным на электронных носителях. Черно-белые штриховые рисунки: формат файла — TIFF (расширение \*.tiff), любая программа, поддерживающая этот формат (Adobe PhotoShop, Adobe Illustrator и т.п.); режим — bitmap (битовая карта); разрешение 600 dpi (пиксели на дюйм); возможно использование сжатия LZW или другого; носители CD-R, CD-RW; обязательно наличие распечатки, причем каждая иллюстрация должна быть распечатана на отдельном листе. Текст на иллюстрациях должен быть четким.

**12. ПОДПИСИ К РИСУНКАМ И ФОТОГРАФИЯМ** группируются вместе и даются на отдельном листе. Каждый рисунок должен иметь общий заголовок и расшифровку всех сокращений. В подписях к графикам указываются обозначения по осям абсцисс и ординат и единицы измерения, приводятся пояснения по каждой кривой. В подписях к микрофотографиям указываются метод окраски и увеличение.

**13. ОФОРМЛЕНИЕ ТАБЛИЦ:** сверху справа необходимо обозначить номер таблицы (если таблиц больше, чем одна), ниже дается ее название. Сокращения слов в таблицах не допускаются. Все цифры в таблицах должны соответствовать цифрам в тексте и обязательно должны быть обработаны статистически. Таблицы можно давать в тексте, не вынося на отдельные страницы.

## 14. БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ СПИСКИ.

Правильное описание используемых источников в списках литературы является залогом того, что цитируемая публикация будет учтена при оценке научной деятельности ее авторов и организаций, в которых они работают.

В оригинальных статьях допускается цитировать не более 30 источников, в обзорах литературы — не более 60, в лекциях и других материалах — до 15. Библиография должна содержать, помимо основополагающих работ, публикации за последние 5 лет.

В списке литературы все работы перечисляются в порядке их цитирования. Библиографические ссылки в тексте статьи даются цифрой в квадратных скобках.

Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

*Библиографическое описание книги* (после ее названия): город (где издана); после двоеточия название издательства; после точки с запятой год издания. Если ссылка дается на главу книги: (авторы); название главы; после точки ставится «В кн.:» или «In:» и фамилия(и) автора(ов) или редактора(ов), затем название книги и выходные данные.

*Библиографическое описание статьи из журнала:* автор(ы); название статьи; название журнала; год; том, в скобках номер журнала, после двоеточия цифры первой и последней страниц.

При авторском коллективе до 6 человек включительно упоминаются все, при больших авторских коллективах 6 первых авторов «и др.», в иностранных «et al.»; если в качестве авторов книг выступают редакторы, после фамилии, после запятой, следует ставить «ред.», в иностранных «ed.»

**Учитывая требования международных систем цитирования, библиографические списки входят в англоязычный блок статьи — References — и, соответственно, должны даваться не только на языке оригинала, но и в латинице (романским алфавитом).** Поэтому авторы статей должны давать список литературы в двух вариантах: один на языке оригинала (русскоязычные источники кириллицей, англоязычные латиницей), и отдельным блоком тот же список литературы (References) в романском алфавите для международных баз данных, повторяя в нем все источники литературы, независимо от того, имеются ли среди них иностранные. Если в списке есть ссылки на иностранные публикации, они полностью повторяются в списке, готовящемся в романском алфавите.

**Транслитерируются фамилии авторов и русскоязычные названия источников. Переводятся названия статей, монографий, сборников статей, конференций с указанием после выходных данных, которые даются в цифровом формате, его**



языка (in Russian). Название источника выделяется курсивом.

Список литературы в латинице может готовиться с помощью систем транслитерации свободного доступа (<http://www.translit.ru>) и переводчика Google. Вручную делать транслитерацию не допускается в целях избежания ошибок.

Поскольку возможны различные варианты транслитерации фамилий, при приготовлении ссылок на статьи, опубликованные в журналах, рекомендуется использование данных с сайтов [www.medlit.ru](http://www.medlit.ru) или [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru).

**Технология подготовки ссылок с использованием системы автоматической транслитерации и переводчика**

На сайте <http://www.translit.ru> можно воспользоваться программой транслитерации русского текста в латиницу.

1. Входим в программу Translit.ru. В окошке «варианты» выбираем систему транслитерации **BGN (Board of Geographic Names)**. Вставляем в специальное поле весь текст библиографии, кроме названия статьи, на русском языке и нажимаем кнопку «в транслит».

2. Копируем транслитерированный текст в готовящийся список References.

3. Переводим с помощью переводчика Google название статьи, монографии, сборника, конференции и т.д. на английский язык, переносим его в готовящийся список. **Перевод, безусловно, требует редактирования.**

4. Объединяем описания в транслите и переводное, оформляя в соответствии с принятыми правилами. При этом необходимо раскрыть место издания (Moscow) и, возможно, внести небольшие технические поправки.

5. В конце ссылки в круглых скобках указывается (in Russian). Ссылка готова.

**Примеры транслитерации русскоязычных источников литературы для англоязычного блока статьи**

Описание статьи из журнала

Krasovsky G.N., Yegorova N.A., Vykov I.I. Methodology of harmonizing

hygienic standards for water substances, and its application to improving sanitary water legislation. *Vestnik Rossiyskoy AMN*. 2006; 4: 32-6. (in Russian)

**Описание статьи из электронного журнала**

Белозеров Ю.М., Довгань М.И., Османов И.М., Шабельникова Е.И., Магомедова Ш.М. Трофотропное влияние карнитена у подростков с пролапсом митрального клапана и повышенной утом-

ляемостью. 2011. Available at: [http://www.rosmedportal.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1388:2011-10-04-02-23-15&catid=25:the-project](http://www.rosmedportal.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1388:2011-10-04-02-23-15&catid=25:the-project) (Accessed 31 October 2013).

**Описание книги (монографии, сборника):**

Pokrovskiy V.M., Korot'ko G.F., eds. *Human physiology*. 3rd ed. Moscow: Meditsina; 2013. (in Russian)

From disaster to rebirth: the causes and consequences of the destruction of the Soviet Union. Moscow: HSE Publ.; 1999. (in Russian)

Latyshev V.N. *Tribology of cutting. v.1: Frictional processes in metal cutting*. Ivanovo: Ivanovo St. Univ.; 2009. (in Russian)

**Описание материалов конференций**

Usmanov T.S., Gusmanov A.A., Mullagalina I.Z., Muhametshina R.Ju., Chervyakova A.N., Sveshnikov A.V. Features of the design of field development with the use of hydraulic fracturing. In: *New energy saving subsoil technologies and the increasing of the oil and gas impact: Proceedings of the 6th International symposium*. Moscow; 2007: 267-72. (in Russian)

**Описание Интернет-ресурса:**

APA Style (2011). Available at: <http://www.apastyle.org/apa-style-help.aspx> (accessed 5 February 2011).

**Описание диссертации:**

Semenov V.I. *Mathematical modeling of the plasma in the compact torus*: diss. Moscow; 2003. 300 p. (in Russian)

**Описание ГОСТа:**

State Standard 8.586.5-2005. Method of measurement. Measurement of flow rate and volume of liquids and gases by means of orifice devices. Moscow: Standartinform Publ.; 2007. (in Russian)

**Описание патента:**

Palkin M.V. *The way to orient on the roll of aircraft with optical homing head*. Patent 2280590, RF; 2006. (in Russian)

**Примеры оформления ссылок на литературу для русскоязычной части статьи**

**Журнальные статьи:**

Веркина Л.М., Телесманич Н.Р., Мишин Д.В., Ботиков А.Г., Ломов Ю.М., Дерябин П.Г. и др. Конструирование полимерного препарата для серологической диагностики гепатита С. *Вопросы вирусологии*. 2012; 1: 45-8.

Чучалин А.Г. Грипп: уроки пандемии (клинические аспекты). *Пульмонология*. 2010; Прил. 1: 3-8.

Aiuti A., Cattaneo F., Galimberti S., Benninghoff U., Cassani B., Callegaro L. et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N. Engl. J. Med*. 2009; 360(5): 447-58.

Glauser T.A. Integrating clinical trial data into clinical practice. *Neurology*. 2002; 58(12, Suppl. 7): S6-12.

#### Книги:

Медик В.А. *Заболеемость населения: история, современное состояние и методология изучения*. М.: Медицина; 2003. 512 с.

Воробьев А.И., ред. *Руководство по гематологии*. 3-е изд. т. 3. М.: Ньюдиамед; 2005. 416 с.

Радзинский В.Е., ред. *Перионеология: Учебное пособие*. М.: РУДН; 2008.

Beck S., Klobes F., Scherrer C., eds. *Surviving globalization? Perspective for the German economic model*. Berlin: Springer; 2005.

Michelson A.D., ed. *Platelets*. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2007. 1398 p.

Mestecky J., Lamm M.E., Strober W., eds. *Mucosal immunology*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Academic Press; 2005. 2064 p.

#### Главы в книге:

Иванова А.Е. Тенденции и причины смерти населения России. В кн.: Осипов В.Г., Рыбаковский Л.Л., ред. *Демографическое развитие России в XXI веке*. М.: Экон-Информ; 2009: 110-31.

Silver R.M., Peltier M.R., Branch D.W. The immunology of pregnancy. In: Creasey R.K., Resnik R., eds. *Maternal-fetal medicine: Principles and practices*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2004: 89-109.

#### Материалы научных конференций, авторефераты:

Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии: Материалы научно-практической конференции. Санкт-Петербург, 8 июля 2009 г. СПб.; 2009.

Салов И.А., Маринушкин Д.Н. Акушерская тактика при внутриутробной гибели плода. В кн.: *Материалы IV Российского форума «Мать и дитя»*. М.; 2000; ч. 1: 516-9.

European meeting on hypertension. Milan, June 15-19, 2007. Milan; 2007.

Harnden P., Joffe J.K., Jones W.G., eds. Germ cell tumours V: Proceedings of the 5<sup>th</sup> Germ cell tumour conference. 2001, Sept. 13-15; Leeds; UK. New York: Springer; 2001.

Мельникова Н.В. *Клинико-биохимические и морфологические изменения печени у больных с атерогенной дислипидемией: Дисс. на соискание ученой степени канд. мед. наук*. М.; 2008.

Borkowski M.M. *Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans: diss.* Mount Pleasant (MI): Central Michigan University; 2002.

#### Электронные источники:

Резолюция, принятая Генеральной Ассамблеей Организации Объединенных Наций №66/288. Будущее, которого мы хотим. 27 июля 2012 года. Available at: [http://www.uncsd2012.org/thefuturewe-](http://www.uncsd2012.org/thefuturewe)

want.html; <http://daccess-dds-ny.un.org/doc/UNDOC/GEN/N11/476/12/PDF/N1147612.pdf?OpenElement>.

Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am. J. Nurs.* 2002; 102 (6). Available at: <http://www.psvedu.ru/journal/2011/4/2560.phtml>.

Названия журналов и книг даются курсивом.

Автор несет ответственность за правильность библиографических данных.

## 15. РЕДАКЦИОННАЯ ЭТИКА

*Достоверность данных.* Согласно этическим обязательствам ученые должны представлять достоверные результаты научной работы для публикации.

*Авторство.* Все лица, обозначенные как «авторы», должны соответствовать критериям этого понятия. Участие каждого автора в работе должно быть достаточным для того, чтобы принять на себя ответственность за ее содержание. Право называться автором основывается на следующих фактах:

1) значительном вкладе в концепцию исследования или анализ и интерпретацию данных;

2) подготовке текста статьи или внесении принципиальных изменений;

3) окончательном утверждении версии, которая сдается в печать.

Участие, заключающееся только в обеспечении финансирования или подборе материала для статьи, не оправдывает включения в состав авторской группы. Общее руководство исследовательским коллективом также не признается достаточным для авторства.

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, должны быть перечислены с их согласия в разделе «Выражение признательности».

Порядок, в котором будут указаны авторы, определяется их совместным решением.

*Конфликт интересов.* Конфликт интересов, касающийся конкретной рукописи, возникает в том случае, если один из участников процесса рецензирования или публикации — автор, рецензент или редактор — имеет обязательства, которые могли бы повлиять на его мнение. Наиболее частая причина возникновения конфликта интересов — финансовые отношения. Возможны и другие причины — личные отношения, научное соперничество.

Участники процесса рецензирования и публикации должны сообщать о наличии конфликта интересов.

*Соблюдение прав больных и конфиденциальность.* Больные имеют право на сохранение конфиденциальности, которую нельзя нарушать без их согласия. Позволяющая установить личность информация, включая имена больных, инициалы, номера больниц и историй болезни, не должна публиковаться в

виде письменных описаний, фотографий и родословных, если только эта информация не представляет большую научную ценность или если больной не предоставит письменное согласие на публикацию. Авторы должны предоставить в редакцию письменное информированное согласие больного на распространение информации и сообщить об этом в статье.

*Защита человека и животных* при проведении научного исследования. Если в статье имеются описания экспериментов с участием человека/людей, авторы должны указать, проводились ли они в соответствии с этическими стандартами комитета, ответственного за эксперименты с участием человека/людей (входящего в состав учреждения или национального) и Хельсинкской декларации 1975 г. и ее пересмотренного варианта 2008 г. При изложении экспериментов с участием животных авторы должны указать, выполнялись ли требования национального руководства и руководства учреждения по содержанию и использованию лабораторных животных.

*Множественные публикации.* Редакция не рассматривает рукописи, одновременно представленные для публикации в другие журналы, а также работы, которые в большей части уже были опубликованы в виде статьи или стали частью другой работы, представленной или принятой для публикации каким-либо другим печатным изданием или электронными средствами массовой информации. Эта политика не иск-

лючает рассмотрение статьи, не принятой к публикации другим журналом, или полного описания, представленного после публикации предварительных результатов (тезисов), представленных на профессиональных конференциях.

\* \* \*

Статьи, оформление которых не соответствует настоящим требованиям, рассматриваться не будут. Присланные рукописи, которым отказано в публикации, обратно не возвращаются.

**Авторские экземпляры** не предусмотрены; журнал можно получить только по подписке.

С подробным изложением пунктов «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанными Международным комитетом редакторов медицинских журналов, в частности этических вопросов, можно ознакомиться на нашем сайте (в переводе от 2006 года), оригинальную версию (на английском языке, 2010 год) можно посмотреть на сайте [www.ICMJE.org](http://www.ICMJE.org).

**Статьи направляются по адресу: 125315, Москва, ул.Балтийская, 8. НИИ общей патологии и патофизиологии. Редакция журнала «Патологическая физиология и экспериментальная терапия».**  
E-mail: [path.physiol@yandex.ru](mailto:path.physiol@yandex.ru)